

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Biología Molecular**



**TESIS DOCTORAL**

**Estructura fina de la población de *Klebsiella pneumoniae* ST11 productora de OXA-48 del Hospital Universitario La Paz determinada por secuenciación genómica.**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

**Alma María Sotillo Torquemada**

**Madrid, 2017**



## **FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Biología Molecular**

**Estructura fina de la población de *Klebsiella pneumoniae* ST11 productora de OXA-48 del Hospital Universitario La Paz determinada por secuenciación genómica.**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

**Alma María Sotillo Torquemada**

Bajo la dirección del doctor

**Jesús Mingorance Cruz**

Realizada en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario La Paz



**Hospital Universitario La Paz**  
Hospital de Cantoblanco  
Hospital Carlos III

 **Comunidad de Madrid**



**Servicio de  
Microbiología  
y Parasitología**

**IdiPAZ**  
Instituto de Investigación  
Hospital Universitario La Paz

# Resumen



# Resumen

Durante la última década se ha observado la dispersión mundial de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo OXA-48 (KpOXA). Se trata de un patógeno oportunista, multirresistente, que produce con frecuencia brotes hospitalarios y que en los países del Mediterráneo se está convirtiendo en endémico. Los brotes epidémicos pueden ser monoclonales u oligoclonales, y suelen estar asociados a unos pocos secuenciotipos que parecen estar adaptados al entorno hospitalario. La dispersión de resistencias a antibióticos parece estar asociada a algunos grupos clonales concretos, por ejemplo, al complejo clonal CC258 donde estaría incluido el secuenciotipo (ST) ST11. OXA-48 es una betalactamasa con capacidad para hidrolizar casi todos los betalactámicos, incluyendo los carbapenémicos, aunque éstos con baja actividad. El gen de la betalactamasa OXA-48 es plasmídico, y las cepas portadoras suelen llevar otras resistencias asociadas. En el Hospital Universitario La Paz (HULP) se detectó KpOXA por primera vez en el año 2010, al mismo tiempo que aparecía en otros hospitales españoles, y desde entonces se ha diseminado por todo el complejo hospitalario en un brote oligoclonal mantenido hasta el presente. Durante los últimos años se ha secuenciado el genoma completo de varios aislados de los dos clones mayoritarios del brote, y en esta Tesis Doctoral se secuencian y comparan los genomas completos de 92 aislados de KpOXA pertenecientes al ST11 (KpOXA-ST11) del HULP y 5 KpOXA-ST11 del Hospital 12 de Octubre (H12O). Para ello, se analizaron los polimorfismos de la secuencia de nucleótidos (SNP) frente a un genoma de referencia. Además, se analizaron las zonas del genoma donde se encontraban algunos elementos de inserción (IS) para intentar establecer relaciones que no se resolvían solo por SNPs. El estudio de ISs se realizó mediante extracción informática de secuenciación de genoma completo y mediante el desarrollo de un protocolo de captura de secuencias. También se estudiaron las variaciones en el número de copias de elementos móviles, IS y plásmidos, y genes de resistencia dentro de la población de KpOXA-ST11.

# Abstract

During the last several years, spreading of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 (KpOXA) has taken place at global scale. KpOXA is a multiresistant opportunistic pathogen and may cause hospital outbreaks. It has become endemic in Mediterranean countries. The outbreaks may be monoclonal or oligoclonal and are usually associated with particular sequence types linked to hospitals. The spread of antibiotic resistance is associated with specific clonal complexes, for example CC258, which includes ST11 sequence type. OXA-48 is a betalactamase which is able to hydrolyze carbapenems with low activity. The OXA-48 gene is plasmidic and often is associated with other resistance genes. The first isolate of OXA-48 at the University La Paz Hospital (HULP) was detected in 2010. Since then, OXA-48 has been isolated in this and other Spanish hospitals. The outbreak in the HULP is oligoclonal. In the last years the whole genome of two major clones has been sequenced. In this work the whole genome of 92 isolates of *K. pneumoniae* ST11 producing OXA-48 (KpOXA-ST11) from HULP and 5 KpOXA-ST11 from 12 de Octubre Hospital (H12O) were analyzed. The aim of this study is to understand the population dynamics inside the hospital and to establish the phylogenetic relationships between the isolates. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were detected by comparison with a reference genome. Furthermore, the localization of different insert elements (IS) was studied with the goal to establish unresolved relationships by SNPs. The IS study was performed by two techniques: the first one consisted in an informatic extraction of the IS sequences of the whole genome and the second one consisted in the development of a new protocol of sequence capture. The variability of the mobile elements in the KpOXA-ST11 was also studied; this included plasmids, IS and resistance genes.

*A mis padres y a Sara.*

Gracias por vuestro apoyo y amor incondicional.

*“Todo parece imposible hasta que se hace.”*

Nelson Mandela.



# Agradecimientos





Quería dar las gracias a la persona que ha hecho esto posible, Jesús Mingorance Cruz, que ha sido director de esta tesis. Estos años he tenido un jefe, he tenido un mentor y un amigo del que he tenido la suerte de aprender de la mano. Mi forma de trabajar te la debo a ti. Gracias Sensei.

A Julio García Rodríguez, que me ha permitido pasar estos años formándome en su servicio. Contigo me han salido “siete filas de dientes”, muchas gracias por tenerme en cuenta, formarme y regañarme cuando me lo he merecido.

Gracias a mi familia y en especial a vosotros, Papá, Mamá y Sara. Vuestra paciencia infinita, por vuestras palabras de apoyo, por entender que no se habla del trabajo fuera del trabajo y sobre todo por el inmenso amor que me demostráis día a día. Gracias a mis abuelos, tíos y primos, por no cansarse de desearme lo mejor, pero a los investigadores no “nos hacen hijos”. Gracias por haberme apoyado cuando las cosas se ponían difíciles porque “así SI me estáis ayudando”.

Gracias a Gema, mi amiga del alma, por todos estos años de amistad, por preguntarme todas las semanas que tal estoy aunque mi respuesta sea “todo bien” y porque habiendo crecido juntas, parte de como soy, es gracias a ti. Gracias por sentirte orgullosa de mí aunque no lo merezca.

Gracias a Dani, que siempre sabe apretarme las tuercas cuando no paro de quejarme y ver el lado bueno de las cosas. Sabes cómo sacarme una sonrisa pero también sabes cuándo necesito un hombro (algo alto) para apoyarme. La persona con la que tengo más complicidad, estoy feliz de poder compartir este día contigo. Y gracias por traer a María a la familia, pura luz.

Gracias a Aurora, Borja, Aniol, Ugo, Nacho y Andrés (la portada es diseño suyo, las quejas a él), en estos últimos tiempos algo más complicados habéis sido (y sois) un pilar básico, fundamental e indispensable. Gracias por las cañas, los consejos, los barranquitos, las risas y las locuras. Sin vosotros haber llegado hasta aquí hubiera sido menos bonito y sobretodo más difícil.

Gracias a mis *Kefitos*, Ana, Berta, Bego, Carol, Maca, Marta, Mapi, Maria, Mela, Laura y Paula, sois capaces de hacer cualquier cosa en cualquier sitio, pero lo importante es que sea siempre “juntaaaaaaaaas”. Con vosotras he vivido experiencias obligatorias para cualquier persona, gracias chicas. Gracias por estar ahí incondicionalmente.

Gracias a mis compañeras de La Paz, Natalia S, Natalia F, Elena, Estefanía y Patri, con vosotras he pasado tiempos buenos, tiempos malos, risas y llantos pero sobretodo he pasado 5 años

aprendiendo de todas y cada una de vosotras. Natalia S, en estos últimos tiempos tú has sido un gran apoyo y una gran amiga, gracias.

Gracias a la gente del Servicio de Microbiología del Hospital La Paz, que me han tratado como si fuera una residente más (me ha costado ganarme mi plaza en el muro de la fama). Gracias a los técnicos por escucharme cuando os pedía algo, gracias a los adjuntos por el tiempo que muchos habéis dedicado a enseñarme y sobre todo gracias a TODOS los residentes. Me llevo muchos amigos de este servicio y de otros, a vosotros, Anita, Ana, Fer, Jorge, Paula, César, Mehdi, Almu, Laura y Dani habéis sido parte fundamental en este camino. Esto ha sido muy complisí, esto lo que es... es muy difícil, pero ha merecido la pena por vosotros. Fer, cuando esto acabe no volverás a hablar de NGS conmigo.

A la gente que me ha acompañado en esta última etapa fuera de La Paz, muchas gracias a Rafa Delgado por darme la oportunidad de aportar alguno de mis conocimientos en su laboratorio en el Hospital 12 de Octubre. A la persona que me enseñó a trabajar en el cuarto de cultivos, Joanna, gracias por tu cariño, tu dedicación y las risas, el cambio se hizo más llevadero gracias a ti. A mis Bichillas, Dafne, Esther V, Jenny, Merce, Ariadna, Mar y Esther, gracias por acogerme como una más, por hacerme sentir tan querida y por el apoyo y el cariño que siempre me habéis demostrado aunque se me olvide avisar que bajo a por un café.

A las chicas del HIV, Mónica (una gran profesional y sobretodo mejor persona), Paquita (me pensaré lo de ser *blogger*), Sagrario (lo que la achucho a la pobre), a Fátima (siempre con una sonrisa) y como no, a mis niñas, Sami, Pau e Inés (como vuestra reina déspota quiero que sepáis que os adoro y que ojala sea capaz de transmitiros mis conocimientos como lo han hecho conmigo), sin todas vosotras me hubiera sido mucho más complicado llegar.

A mis Monstruitas, Ana, Carol, Bea, Elena, Pati, Iciar y como no, a los Biolocos, Sergio, Blanca, Miguel, Chyo, Borja, Charly, Sevi y Javieh. Con vosotros empezó todo esto hace 12 años cuando nos encontramos siendo unos niños en la universidad. A pesar de todo este tiempo seguimos siendo igual de amigos y somos capaces de irnos todos juntos a Japón si la ocasión lo merece. Gracias por entender mejor que nadie lo que representa finalizar este proyecto.

Gracias a Leire, Gema, Ana y Guille por Las Noches de los Jueves, lo que empezó como una costumbre y se convirtió en una tradición. Los únicos que comprenden la importancia de un buen salseo.

Gracias a los Trepadores, con vosotros he aprendido que tengo una afición y que encima es un deporte. Gracias a Felipe por la sabrosura, a David por explicarme Juego de Tronos, a Diego por meterme en el cuerpo la afición de la escalada, a Mac por acompañarle. A todos vosotros, Papablo, Xavi, Natali, Isa, Gabi, Cricri, Pablo Logroño gracias por la escalada y las cañas de después (que son lo importante).

A los nuevos Salamandreros, habéis llevado la escalada a un nivel nuevo, ir de viaje a escalar para no escalar, gracias a todos por haber conseguido que me despeje, que sea feliz y que pase momentos inolvidables con todos y cada uno de vosotros. Vuestra locura es contagiosa.

# Abreviaturas y siglas



## A

ADP	Adenosín difosfato
AP/AE	Atención Primaria/Atención Especializada Ambulatoria
ATP	Adenosín trifosfato

## B

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLEEs	Betalactamasas de Espectro Extendido

## C

CC	Complejo clonal
CE	Consultas Externas
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CN	Número de copias ( <i>Copy Number</i> )

## D

DR	Repeticiones directas
----	-----------------------

## E

EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
EPCs	Enterobacterias Productoras de Carbapenemasas

## H

H12O	Hospital 12 de Octubre
HB	Hospital de Cantoblanco
HG	Hospital General
HI	Hospital Infantil
HLH	<i>Helix-loop-helix</i>
HM	Hospital Maternal
HRT	Hospital de Rehabilitación y Traumatología
HULP	Hospital Universitario La Paz

## I

IR	Secuencias repetidas invertidas
IS	Elementos de inserción

## K

KpOXA      *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo OXA-48

KpOXA-ST11   *K. pneumoniae* productores de OXA-48 secuenciotipo ST11

## M

MALDI-TOF   *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight*

MLST      Tipificación multilocus de secuencias (*Multilocus Sequence Typing*)

MRR      Regiones de multirresistencia (*Multiresistance regions*)

## N

NGS      Secuenciación masiva de nueva generación (*Next Generation Sequencing*)

## O

ORF      Marcos de lectura (*Open Reading Frame*)

## P

PBPs      Proteínas que unen penicilina (*Penicillin Binding Protein*)

PCR      Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PFGE      Electroforesis de campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis*)

Pi      Fosfato inorgánico

PNK      Polinucleótido Kinasa

PU      *Loop palindromic units*

## R

RAPD      Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (*Random Amplification of Polymorphic DNA*)

RAST      *Rapid Annotation using Subsystem Technology*

REP-PCR      Amplificación por PCR de elementos Palindrómicos Extragénicos Repetitivos (*Repetitive Element Palindromic PCR*)

RL      Secuencias de reconocimiento

## S

SNPs      Polimorfismos de un único nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*)

SSC      Citrato de sodio salino

ST      secuenciotipo

Strep-MBs      Partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina

## W

WGS      Secuenciación de genomas completos (*Whole Genome Sequencing*)



AATCGATCGAAATTCGATCGAATCGATCCATAGCATATACGACGACGATCAGCATGCTAGGCCGGATCGCACGAAACGAAATCGA  
CGATCCATAGCATATACGACGACGATCAGCATGCTAGGCCGGATCGCACGTACGAACGAAATCGATCGAATCGCCAT  
TATACGACGAGCATGCAGGCTCGCACGACGACGAAATCGATCGAATCGATCCAGCATATACGACGACGAT  
ATGCTAGGCCGGATCGCCGATCGAATCGATCCATAATCGATCGAATAATCGATCGAATCGATCCAT  
TATACGACGACGATCAGCATGCTGGCCGGATCGCACGAAACGAAATCGATCGTCGATCCATA  
ATACGACGACGATCAGCATGCTAGGCCGGATCGCACGTACGAACGAAATCGATCGA  
CCATAGCATATACGACGAGCATGCAGGCTCGCACGACGACGAAATCGATCGA  
ATCCAGCATATACGACGACGATCAGCATGCTAGGCCGGATCGCCGATCG  
GATCCATAGCATATACGACGCGATCAGCATGCTAGGCCGGATGCTC  
CATAGCATAGCATATACGAATCGATCGAATAATCGATCGAATC  
CATAGCATATACGACGACGATCAGCATGCTGGCCGGATCG  
AACGAAATCGATCGTCGATCCATAGCATATACGACG  
TCAGCATGCTAGGCCGGATCGCACGTACGAACGA  
GATCGAATCGCCATAGCATATACGACGAGCA  
GGCTCGCACGACGACGAAATCGATCGAAT  
CCAGCATATACGACGACGATCAGCATG  
GCCGGATCGCCGATCGAATCGATCC  
CATATACGACGCGATCAGCATGC  
CCGGATGCTCGATCCATAGCA  
CGATCAGCATGCTAGGCCG  
AATCGATCGAATAATCGA  
ATCGATCCATAGCATAT  
CGACGATCAGCATGC  
CGGATCGCACGA  
AATCGATCGTC  
CATAGCATAT  
CGACGAT  
TGCTAG  
GATCG  
TAC  
GA  
G

# Índice



<b>Introducción</b>	27
1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> OXA-48	29
1.1. Resistencias a carbapenems	29
1.2. Distribución Mundial de Carbapenemasas	32
1.3. KpOXA en España	35
1.4. KpOXA en el Hospital La Paz	37
1.4.1. Diseminación del brote hasta Septiembre de 2017	37
1.4.2. Características clonales del brote	39
1.5. Factores de riesgo de adquirir KpOXA	40
2. Epidemiología	42
2.1. Técnicas de epidemiología	42
2.2. Epidemiología de <i>K. pneumoniae</i>	44
3. Elementos de inserción	46
3.1. Elementos de inserción en KpOXA-ST11	47
3.1.1. ISEcp1	47
3.1.2. IS26	47
3.1.3. ISKpn1	47
3.1.4. ISKpn14	48
<b>Objetivos</b>	51
<b>Material y métodos</b>	53
1. Contexto hospitalario y selección de muestras biológicas	55
1.1. Hospital Universitario La Paz	55
1.2. Hospital Universitario 12 de Octubre	55
1.3. Selección de muestras biológicas	56
2. Medios de cultivo y extracción de ADN	57
3. Estructura fina de la población de KpST11	58
3.1. Ensamblaje de la cepa de referencia: Kp2	58
3.2. Preparación de las secuencias y mapeo de SNPs	59
4. Elementos móviles y genes de resistencia a antibióticos en KpST11	61
5. Captura de híbridos	63
5.1. Preparación del ADN	63
5.2. Enriquecimiento en las zonas colindantes a los IS	65
5.3. Amplificación de híbridos	67
5.4. Preparación de librerías y NGS	68
5.5. Análisis de híbridos	68



<b>Resultados</b>	69
1. Estructura fina de la población de KpST11	71
1.1. Ensamblaje de la cepa de referencia: Kp2-ST11.	71
1.2. Análisis de polimorfismos (SNPs)	73
2. Elementos Móviles y Genes de Resistencia	82
2.1. Variabilidad en el contenido de plásmidos y genes de resistencia	82
2.2. Mapeo de los elementos de inserción con respecto a Kp2	87
3. Análisis KpST11 por unidades	91
3.1. Análisis de SNPs y Elementos de inserción en la Unidad G08C	91
3.2. Análisis de SNPs y Elementos de inserción en la Unidad G02C	94
4. Detección de IS por captura de secuencias	96
4.1. Desarrollo del protocolo de captura.	96
4.2. Muestras seleccionadas para captura de secuencias.	97
4.3. Análisis de las muestras	97
<b>Discusión</b>	103
1. Diversidad de la población de KpST11	104
2. Variabilidad en genes de resistencia y plásmidos	106
3. IS como herramienta para aumentar la resolución del análisis genómico	108
4. Dinámica de la población de KpST11 en dos unidades concretas	109
5. Protocolo para determinar la localización genómica de los IS mediante secuenciación masiva dirigida	111
<b>Conclusiones</b>	117
<b>Bibliografía</b>	119
<b>Material suplementario</b>	143

# Introducción



# 1. *Klebsiella pneumoniae* OXA-48.

*Klebsiella pneumoniae* pertenece a la familia de las enterobacterias. Es una bacteria capaz de vivir en distintos nichos ecológicos como el suelo y las aguas residuales. Para los humanos es un miembro de la microbiota intestinal capaz de producir infecciones oportunistas (1).

*K. pneumoniae* es la segunda enterobacteria causante de infección nosocomial y comunitaria después de *Escherichia coli* (2). Hasta la década de los 70 la mayoría de brotes hospitalarios eran causados por cepas resistentes a aminoglucósidos (3), durante la década de los 90 aparecieron cepas capaces de producir betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) (4) y no es hasta la década de los 2000 cuando la llegada de las carbapenemasas empiezan a hacerse patentes en brotes hospitalarios por *K. pneumoniae* (5).

La población de *K. pneumoniae* tiene una estructura clonal compuesta por varios grupos o complejos clonales. Las resistencias a antibióticos parecen estar asociadas a algunos grupos clonales concretos, por ejemplo al complejo clonal (CC) CC258 donde está incluido el secuenciotipo (ST) ST11.

## 1.1. Resistencias a carbapenems.

Los carbapenems son antibióticos de amplio espectro usados en el tratamiento empírico de infecciones nosocomiales graves. También son tratamiento de elección en infecciones producidas por bacterias multirresistentes y en pacientes que han recibido previamente antibióticos de amplio espectro por la posibilidad de haber seleccionado cepas multirresistentes (6).

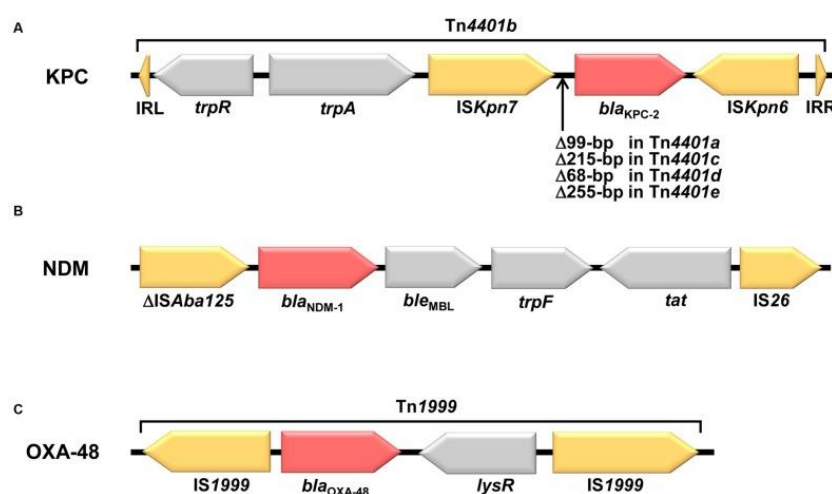
Como otros beta-lactámicos, actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular. Los carbapenems se unen a las PBPs, proteínas que se encargan de entrecruzar los pentapéptidos asociados a las moléculas de N-acetil murámico del peptidoglicano (*penicillin binding proteins*), e inhiben la reacción de transpeptidación, como consecuencia, la pared bacteriana se debilita y se produce la lisis osmótica de la célula bacteriana.

Las carbapenemasas son enzimas con capacidad hidrolítica frente a los beta-lactámicos, incluyendo los carbapenems. Son un grupo heterogéneo de enzimas, y existen representantes en los diferentes grupos de la clasificación de Ambler. Las más destacables son KPC que pertenece a la clase A, NDM y VIM de la clase B y OXA-48 que se clasifica dentro de la

clase D (7). KPC es una enzima con actividad frente a penicilinas, cefalosporinas, aztreonam y carbapenems, y su actividad no se ve afectada por inhibidores como el ácido clavulánico o el tazobactam (8). NDM y VIM tienen un espectro de actividad parecido a KPC pero no hidrolizan el aztreonam. Por otro lado la actividad de OXA-48 incluye cefamicinas, monobactams, cefalosporinas y carbapenems, pero su capacidad hidrolítica frente a carbapenems es baja (9).

La primera bacteria productora de KPC se detectó por primera vez a principios de la década de los 2000 en la ciudad de Nueva York en *K. pneumoniae* (10) dispersándose rápidamente por Estados Unidos (11). El gen que codifica KPC está asociado a un plásmido transmisible. Por otro lado, NDM se identificó por primera vez en 2008 en *K. pneumoniae* y en *E.coli*, en un paciente sueco que había estado hospitalizado previamente en Nueva Delhi por una infección del tracto urinario (12). La primera OXA-48 se aisló en *K. pneumoniae* en 2001 en Turquía (13) y no fue hasta 2009 cuando se detectó el primer caso en España (5). Esta carbapenemasa presentaba menos del 50% de identidad con otras enzimas de tipo OXA como OXA-10, OXA-23, OXA-40 y OXA-1 (13).

El gen *bla<sub>KPC</sub>*, que codifica la carbapenemasa KPC, ha sido descrito en plásmidos de tipo *IncF*, *IncI2*, *IncX*, *IncA/C*, *IncR*, y *ColE1* (14–16) pero el portador más frecuente es *IncF*. Este plásmido suele ir acompañado de otros genes de resistencia a antibióticos como quinolonas, tetraciclinas, trimetoprim, aminoglicósidos o sulfonamidas (14). Con frecuencia aparece asociado a una estructura de unas 10kb que está relacionada con un transposón de tipo *Tn4401* y que porta genes para la transposasa, resolvasa y el gen de *bla<sub>KPC</sub>* flanqueado por dos secuencias de inserción (IS) *ISKpn7* y *ISKpn6* (Figura 1, A) (17).



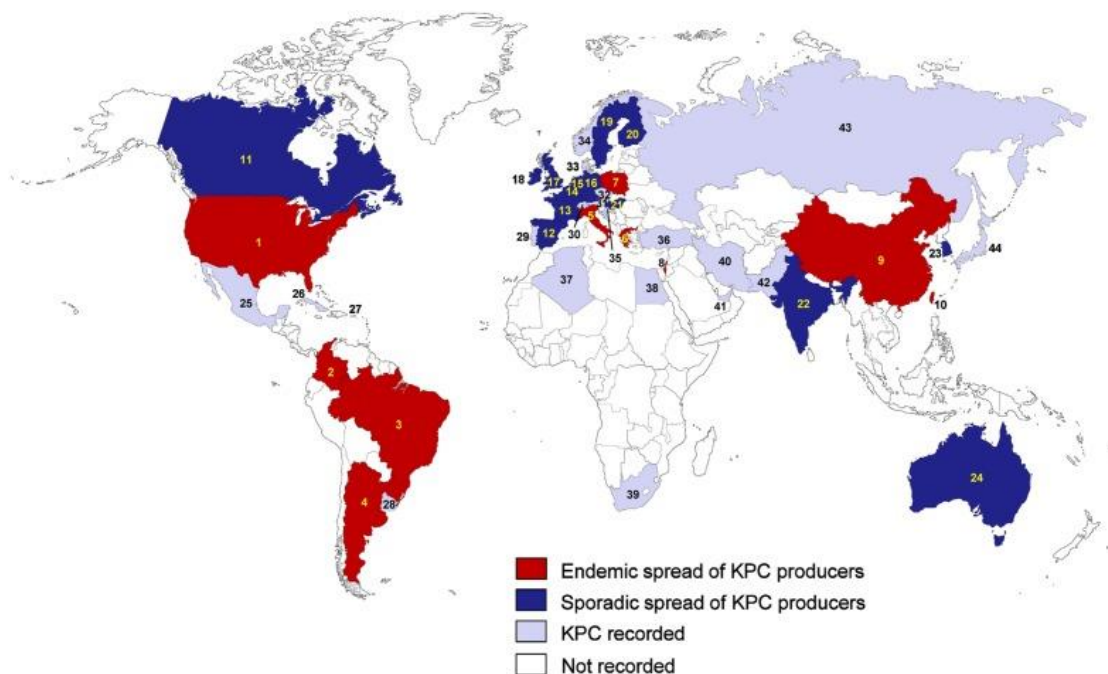
**Figura 1:** Características de la estructura genética de *bla<sub>KPC-2</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>* y *bla<sub>OXA-48</sub>*. (A) El transposón *Tn4401* que contiene *bla<sub>KPC-2</sub>* del plásmido pNYC (nº de acceso GenBank EU176011). Dos secuencias repetidas invertidas (IRL e IRR) de *Tn4401* se representan en triángulos en cada extremo. *Tn4401* tiene cinco isoformas que difieren por delecciones (68-255 pb) justo en el extremo 5' del gen *bla<sub>KPC</sub>*. (B) El contexto genético *bla<sub>NDM-1</sub>* de pNDM\_MGR194 (número de acceso GenBank KF220657). (C) El transposón *Tn1999* que contiene *bla<sub>OXA-48</sub>* del plásmido pOXA-48 (GenBank nº de acceso JN626286). Tomada de Chang Ro et al. 2016 (18).

El gen  $bla_{NDM}$  se encuentra en el transposón *Tn125* flanqueado por dos elementos de inserción de tipo *ISAbi125* e *IS26* (19). En *K. pneumoniae*,  $bla_{NDM}$ , se ha encontrado asociada a diferentes tipos de plásmido como *IncA/C*, *IncF*, *IncR*, *IncH*, *IncN*, *IncL/M* o *IncX* (20–26). Además el plásmido *IncA/C* portador de  $bla_{NDM}$  suele llevar asociados otros genes de resistencia como *rmtA* y *rmtC* asociados a resistencias a aminoglucósidos, betalactamasas de tipo CMY y el gen *qnrA* asociado con resistencias a quinolonas (Figura 1,B) (14).

El gen de  $bla_{OXA-48}$  se encuentra flanqueado por dos elementos de inserción *IS1999* lo que compone el transposón *Tn1999* (27, 28). Este *IS1999* tiene un tamaño de 1.3Kb con repeticiones terminales de 21pb que generan una duplicación de 9pb después de la transposición (29). Este transposón, que porta el gen de  $bla_{OXA-48}$ , se encuentra localizado en un plásmido de tipo *IncL/M*. Este plásmido ha sido el responsable de la dispersión mundial de este tipo de carbapenemasa. El plásmido de tipo *IncL/M* es un plásmido de 62kb que tiene a  $bla_{OXA-48}$  como único gen de resistencia (Figura 1, C). Una de las posibles razones del éxito mundial de la diseminación de esta carbapenemasa reside en el plásmido en el que es transportada, ya que el *Tn1999* se sitúa interrumpiendo el gen *tir* del plásmido. Este gen se encarga de producir una proteína de inhibición de la transferencia del propio plásmido (30).

## 1.2. Distribución Mundial de Carbapenemasas

Se han descrito distribuciones endémicas de *K. pneumoniae* productora de KPC en países como China, Estados Unidos, Italia, Grecia, Colombia, Israel, Brasil o Taiwán. Por otro lado se han descrito casos esporádicos en países como España, Francia, Alemania, Inglaterra, Irlanda, Bélgica, India o Australia (31) (Figura 2). En el caso de *K. pneumoniae* productora de KPC se observa la expansión de una cepa predominante ST258 en la mayoría de países incluidos los Estados Unidos y países europeos (32–34). El 80% de los aislados de *K. pneumoniae* productoras de KPC en Israel pertenecen al clon ST258 (35). Se desconoce por qué el linaje ST258 es el clon más frecuente entre los aislados de *K. pneumoniae* productores de KPC (18).



**Figura 2:** Características epidemiológicas de *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC. (1) Estados Unidos; (2) Colombia; (3) Brasil; (4) Argentina; (5) Italia; (6) Grecia; (7) Polonia; (8) Israel; (9) China; (10) Taiwán; (11) Canadá; (12) España; (13) Francia; (14) Bélgica; (15) Países Bajos; (16) Alemania; (17) Reino Unido; (18) Irlanda; (19) Suecia; (20) Finlandia; (21) Hungría; (22) India; (23) Corea del Sur; (24) Australia; (25) México; (26) Cuba; (27) Puerto Rico; (28) Uruguay; (29) Portugal; (30) Suiza; (31) Austria; (32) República Checa; (33) Dinamarca; (34) Noruega; (35) Croacia; (36) Turquía; (37) Argelia; (38) Egipto; (39) Sudáfrica; (40) Irán; (41) Emiratos Árabes Unidos; (42) Pakistán; (43) Rusia; (44) Japón. Tomada de Chang Ro et al. 2016 (18).

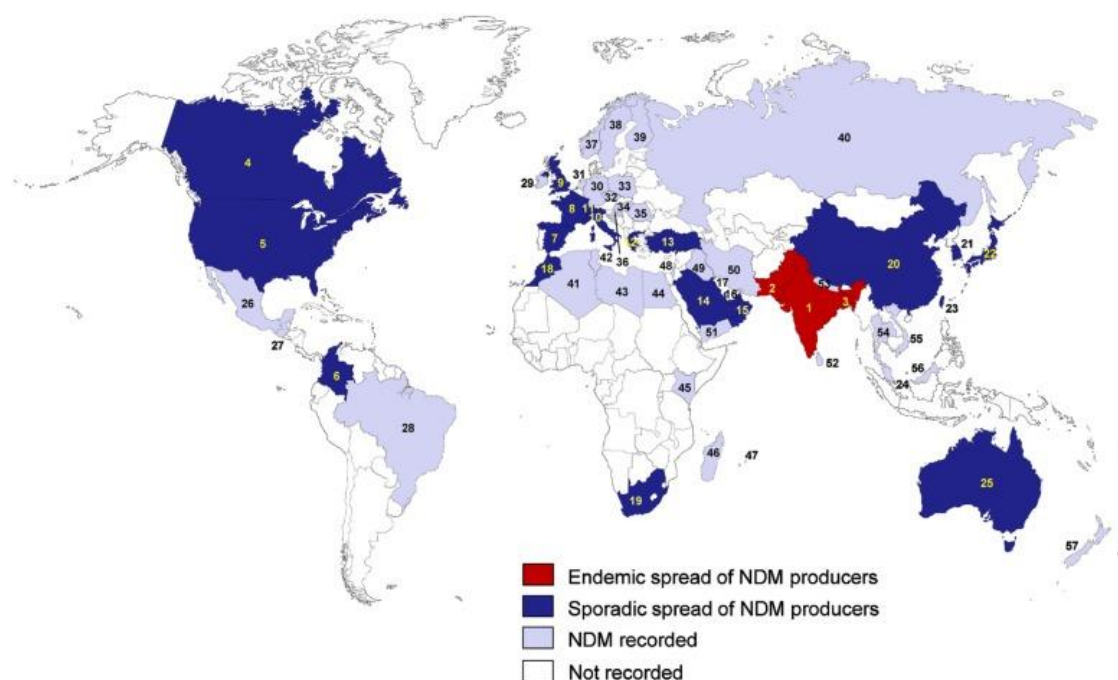
Con respecto a NDM se considera endémica en países como India, Pakistán o Bangladés (36) pero también se han descrito casos y brotes esporádicos en Estados Unidos, Canadá, Francia, Inglaterra, Sudáfrica, Turquía o España entre otros (Figura 3).

Se ha observado que las tasas de colonización por bacterias productoras de NDM en India y Pakistán oscilan entre el 2% y el 13,5% (37–39). Además se han hecho estudios



ambientales en los que en 2011 se encontraron bacterias productoras de NDM en el 4% de las muestras de agua del grifo analizadas y en un 30% de muestras recogidas de agua de piscinas, calles y riachuelos (32).

En *K. pneumoniae* se ha detectado el gen bla<sub>NDM</sub> en distintos secuenciotipos, ST15, ST16, ST17, ST20, ST147, ST258, ST340, ST512 y ST972) y en diferentes plásmidos (*IncF*, *IncA/C* e *IncL/M*) (25, 40, 41).

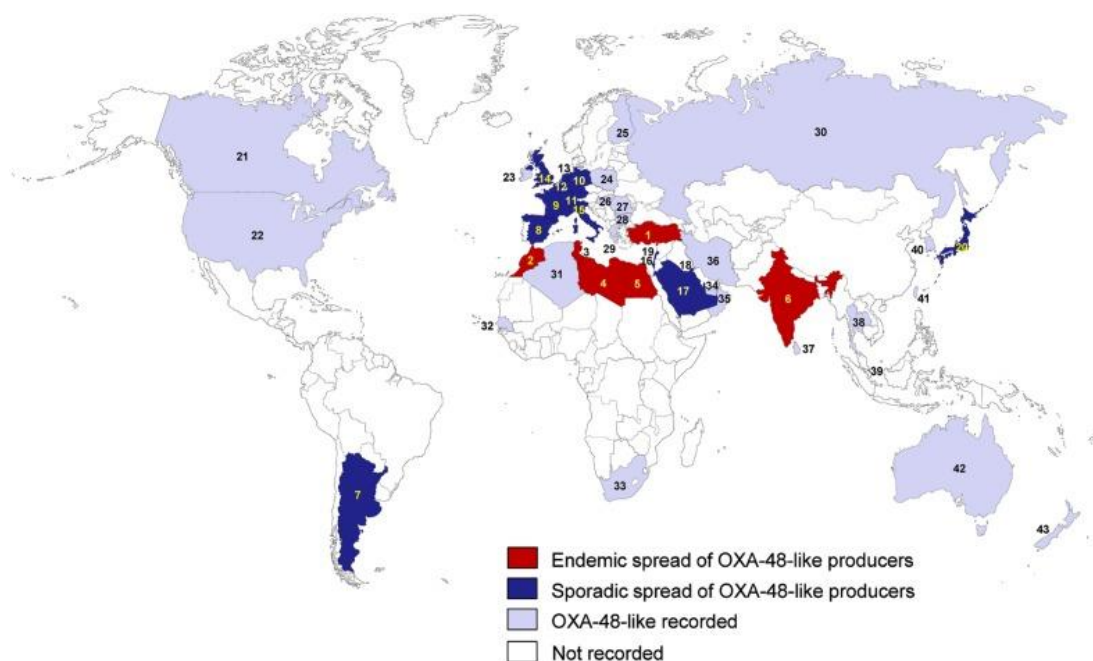


**Figura 3:** Características epidemiológicas de la *K. pneumoniae* productora de NDM. (1) India; (2) Pakistán; (3) Bangladesh; (4) Canadá; (5) Estados Unidos; (6) Colombia; (7) España; (8) Francia; (9) Reino Unido; (10) Italia; (11) Suiza; (12) Grecia; (13) Turquía; (14) Arabia Saudita; (15) Omán; (16) Emiratos Árabes Unidos; (17) Kuwait; (18) Marruecos; (19) Sudáfrica; (20) China; (21) Corea del Sur; (22) Japón; (23) Taiwán; (24) Singapur; (25) Australia; (26) México; (27) Guatemala; (28) Brasil; (29) Irlanda; (30) Alemania; (31) Países Bajos; (32) República Checa; (33) Polonia; (34) Hungría; (35) Rumania; (36) Croacia; (37) Noruega; (38) Suecia; (39) Finlandia; (40) Rusia; (41) Argelia; (42) Túnez; (43) Libia; (44) Egipto; (45) Kenia; (46) Madagascar; (47) Mauricio; (48) Israel; (49) Irán; (50) Yemen; (51) Sri Lanka; (52) Nepal; (53) Tailandia; (54) Vietnam; (55) Malasia; (56) Nueva Zelanda. Tomada de Chang Ro et al. 2016 (18).

En lo que a OXA-48 se refiere, desde 2003 se considera endémica en Turquía, Marruecos, Libia, Egipto, Túnez e India. Países como Bélgica, Holanda, Alemania, Argentina, Líbano, Israel, Japón o Inglaterra han detectado casos y brotes esporádicos y aunque España y Francia están dentro de este grupo, OXA-48 tiene una prevalencia dentro de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas alta para estos dos países, 74% y 78% respectivamente (36, 42) (Figura 4). En Líbano, entre los aislados de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC), el 88% eran productoras de OXA-48 (43) y el 78% en Arabia Saudita, además el 6.3% de las *K. pneumoniae* OXA-48 (KpOXA) eran resistentes a colistina, lo que sugiere que la resistencia a la colistina está aumentando en Arabia Saudita (44). Sin embargo en Estados Unidos la prevalencia de OXA-48 es menor, en torno a un 11% (45). En Rumanía el 78% de las EPCs eran productoras de OXA-48 (46).



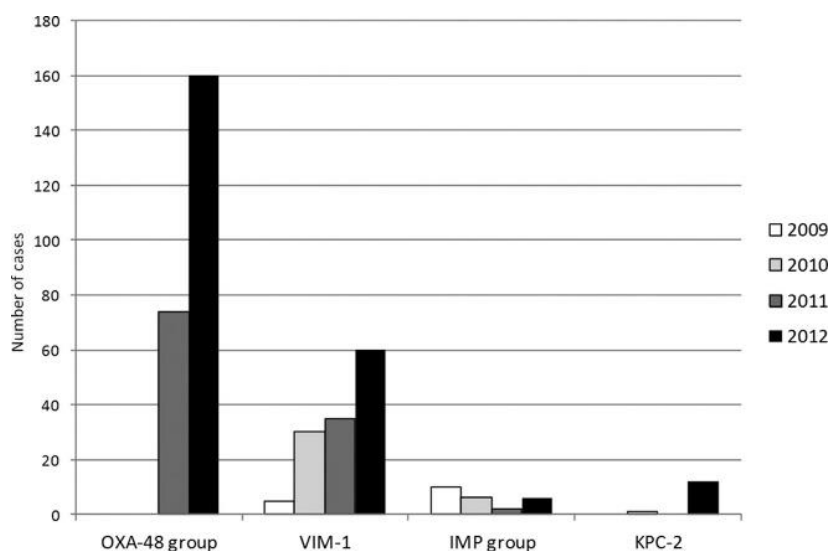
OXA-48 se detecta asociado a ST11 en países como España (47–49), Turquía (50), Argentina (50) y Grecia (51). Aunque también se han aislado casos de KpOXA en ST14, ST15, ST101, ST147 en países como Estados Unidos (45), España (49), República Checa (52), Libia (53), India (45), Alemania (54), Finlandia (55), Francia (56) y Japón (57). Sin embargo en España se ha visto que OXA-48 (71,5%) y VIM-1 (25,3%) fueron las carbapenemasas más frecuentes detectadas. Los secuenciotipos más prevalentes en KpOXA fueron ST11 y ST405 (58), mientras que en el norte de África el secuenciotipo más común es el ST101, seguido de ST395 y ST15 (59).



**Figura 4:** Características epidemiológicas de *K. pneumoniae* de productora de OXA-48. (1) Turquía; (2) Marruecos; (3) Túnez; (4) Libia; (5) Egipto; (6) India; (7) Argentina; (8) España; (9) Francia; (10) Alemania; (11) Suiza; (12) Bélgica; (13) Países Bajos; (14) Reino Unido; (15) Italia; (16) Israel; (17) Arabia Saudita; (18) Kuwait; (19) Líbano; (20) Japón; (21) Canadá; (22) Estados Unidos; (23) Irlanda; (24) Polonia; (25) Finlandia; (26) Hungría; (27) Rumania; (28) Bulgaria; (29) Grecia; (30) Rusia; (31) Argelia; (32) Senegal; (33) Sudáfrica; (34) Emiratos Árabes Unidos; (35) Omán; (36) Irán; (37) Sri Lanka; (38) Tailandia; (39) Singapur; (40) Corea del Sur; (41) Taiwán; (42) Australia; (43) Nueva Zelanda. Tomada de Chang Ro et al. 2016 (18)

### 1.3. KpOXA en España

Hasta 2011 en España la mayoría de casos de EPCs eran de tipo VIM-1, a partir de ese año el número de casos de enterobacterias portadoras de OXA-48 ha aumentado rápidamente convirtiéndose en dominante a partir de ese año (Figura 5)(60).



**Figura 5:** Crecimiento inicial del número de casos de OXA-48 en España. La gráfica muestra el periodo 2009-2012 de las enterobacterias productoras de carbapenemasa y número casos reportados al programa nacional de vigilancia del Instituto de Salud Carlos III. Tomada de Oteo 2013 (60).

En el año 2012 se realizó un estudio en el que participaron 49 hospitales españoles de 24 comunidades. Se recogieron 357 aislados de enterobacterias resistentes a carbapenems, el 66% eran portadores de algún tipo de carbapenemasa. En el 75.4% de los casos se trataba de una KpOXA, y el 19.7% de *K. pneumoniae* productora de VIM. El 88.7% de los aislados pertenecían a uno de los cuatro secuenciotipos mayoritarios: ST11, ST15, ST16 y ST405 (60).

Otro estudio realizado en 83 hospitales españoles en 2013 recogió 702 aislados, de los cuales el 53.3% fueron *K. pneumoniae*. De ese 53.3% *K. pneumoniae* fueron portadoras de carbapenemasa el 74.4% y dentro de las *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas el 86.7% eran KpOXA. Según el secuenciotipo, del 86.7% de *K. pneumoniane* positivos para OXA-48 fueron ST11 el 33.6%, ST405 el 31.1%, ST15 el 9.4% y ST326 el 9.4% (61).

Además, en otro estudio realizado el mismo año, en el que participaron 34 hospitales españoles y se recogieron 245 aislados, el 85.2% de las enterobacterias productoras de OXA-48 fueron *K. pneumoniae*. El 54.1% de los aislados de KpOXA fueron nosocomiales, el 43.2% relacionados con cuidados sanitarios y solo el 2.7% era de la comunidad (62).

Son unos pocos los secuenciotipos de *K. pneumoniae* asociados a la producción de OXA-48 entre los que se pueden destacar ST11, ST405, ST15 y ST16 (47, 63). En España los secuenciotipos más prevalentes de *K. pneumoniae* son ST11 y ST405 (61).

El clon ST11 pertenece al complejo CC258 que se ha expandido por todo el mundo (64). Este clon de alto riesgo es capaz de albergar de manera estable genes de resistencia a antibióticos gracias a elementos móviles, transposones o plásmidos que además puede propagar con otros clones (65) aunque parece que la aptitud de este secuenciotipo produce una ventaja adaptativa más allá de la resistencia(66).

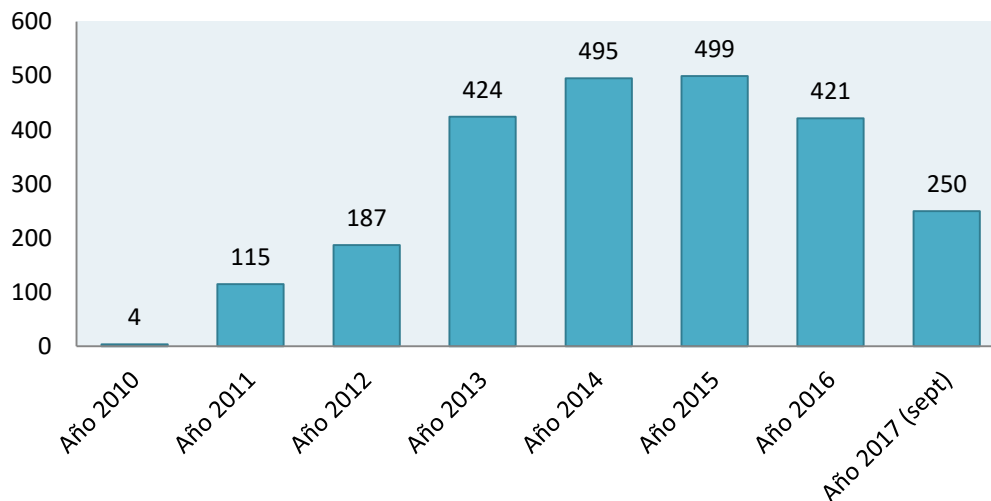
## 1.4. KpOXA en el Hospital La Paz.

El primer caso que se identificó en el Hospital Universitario La Paz (HULP) como productor de carbapenemasa OXA-48 fue un aislado de *K. pneumoniae* obtenido de una muestra de esputo de un paciente ingresado en Reanimación de Cirugía Cardiorrácica el 16 de Diciembre de 2010. Durante ese mes, otros tres aislados fueron identificados como enterobacterias productoras de OXA-48. Los pacientes se encontraban en tres áreas diferentes del hospital: Oncología/Cuidados paliativos, Medicina interna y Reanimación del hospital Maternal. Los antibiogramas de estos aislados presentaban resistencias comunes a Amoxicilina, Piperaciclina, Amoxicilina/Clavulánico, Piperaciclina /Tazobactam, Cefalotina, Cefuroxima, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefepime, Aztreonam, Ertapenem, Imipenem, Cotrimoxazol, Gentamicina y Tobramicina. Todas ellas eran sensibles a Cefoxitina, Ácido nalidíxico, Amikacina, Tigeciclina, Colistina y Fosfomicina. Presentaban resistencia intermedia a Nitrofurantoína y sensible/intermedia a Ciprofloxacino. La susceptibilidad a Meropenem fue intermedia/resistente, dependiendo del aislado. Por otro lado la sensibilidad a ácido nalidíxico y la sensibilidad disminuida o resistencia a ciprofloxacino sugirió la presencia de una resistencia plasmídica a quinolonas.

Después de estos primeros casos llegaron otros durante el año 2011, todos ellos fueron sometidos a un estudio de clonalidad mediante amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), lo que demostró la estrecha relación entre los aislados. Este hecho llevó a la búsqueda retrospectiva de aislados de KpOXA que permitió identificar dos casos más, y en uno de ellos pudo recuperarse del cepario del Servicio de Microbiología el microorganismo responsable.

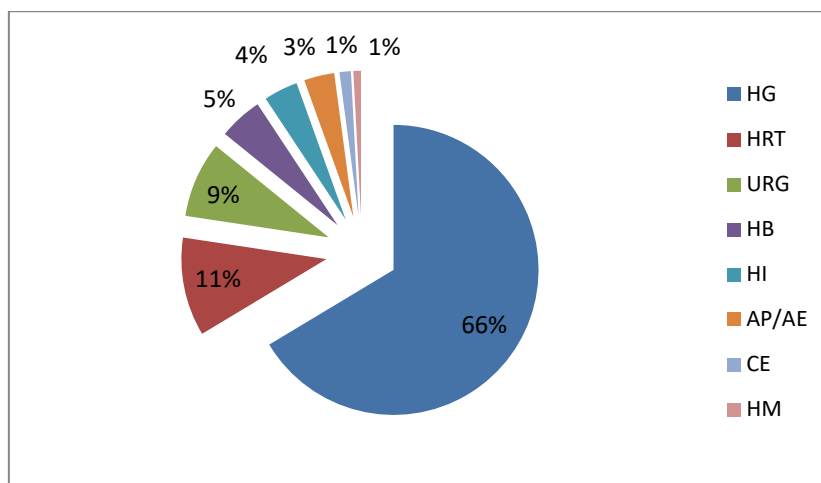
### 1.4.1. Diseminación del brote hasta Septiembre de 2017.

Desde el inicio del brote hasta Septiembre de 2017 se han aislado un total de 2395 pacientes infectados o colonizados por algún tipo de enterobacteria portadora de OXA-48. Se observaron una media de 299 casos (rango 4-499) anuales (Figura 6).



**Figura 6:** Casos anuales de EPCs tipo OXA-48 aislados en el HULP desde el inicio del brote

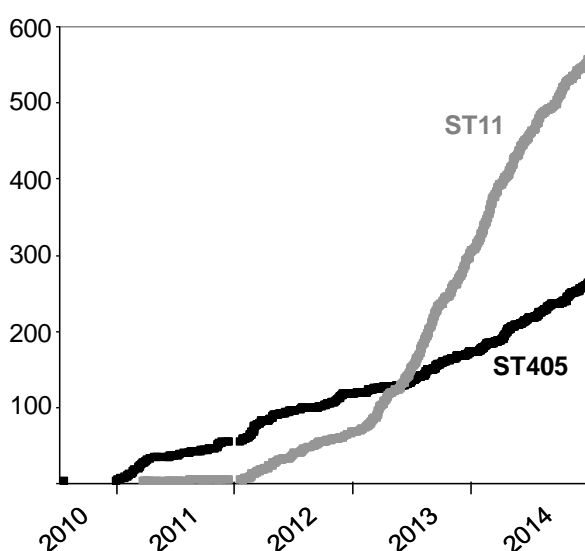
En un análisis previo, incluyendo datos hasta Junio de 2013, se observó que el centro con mayor incidencia de casos fue el Hospital General con 314 casos que representan el 66% del total (Figura 7).



**Figura 7:** Distribución del porcentaje de casos por procedencias hasta Junio de 2013.. HG: Hospital General; HRT: Hospital de Rehabilitación y Traumatología; URG: Urgencias; HB: Hospital de Cantoblanco; HI: Hospital Infantil; AP/AE: Atención Primaria/Atención Especializada Ambulatoria; CE: Consultas Externas; HM: Hospital Maternal. Datos obtenidos de la tesis doctoral de Guillermo Ruiz Carrascoso.

### 1.4.2. Características clonales del brote.

Como medida de control del brote se estableció un protocolo de análisis de clonalidad mediante el uso de un sistema estandarizado, Diversilab™. Hasta mediados del 2013 se analizaron 301 aislados pertenecientes a 16 clones distintos que se numeraron sucesivamente por orden de aparición (aunque dos de ellos, 8 y 14, se incluyeron posteriormente dentro de otros clones anteriores). Hubo dos clones mayoritarios que englobaban más del 80% de los casos (denominados por orden de aparición clon 1 y clon 11), el resto estaba constituido por clones con una frecuencia media (clones 5, 2, 4 y 9) y una serie de clones esporádicos. Los clones establecidos mediante amplificación de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP-PCR) fueron analizados mediante tipificación de secuencias multilocus (MLST). De los clones mayoritarios, el clon 1 pertenecía al secuenciotipo ST405 y los clones 2, 4 y 11 pertenecían al ST11. El clon mayoritario a principio del brote era el clon 1 (ST405) que ha sido secuencialmente desplazado por el clon 11 (ST11) hasta convertirse este en el mayoritario (67)(Figura 8).



**Figura 8.** Número de casos a lo largo del tiempo de los clones mayoritarios de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48. En negro representados los casos de ST405 y en gris ST11. Se observa como a mediados de 2013 se produce un cambio de ST405 por ST11 como clon mayoritario. Imagen modificada de Paño-Pardo et al. 2016 (67).

## 1.4. Factores de riesgo de infección por KpOXA.

Los factores de riesgo de infección por EPCs incluyen la gravedad de la enfermedad (68), procedimientos invasivos (69), estancia previa hospitalaria (70), uso previo de antibióticos (69-72) y no son muy diferentes a los factores de riesgo de otras infecciones nosocomiales (73).

Dentro de los factores intrínsecos al propio paciente, el primer factor es la edad, existen numerosos estudios que demuestran que un grupo de edad avanzada tiene una incidencia mayor de infecciones cuando se les compara con un grupo de menor edad (73–76).

Otro factor es la existencia de enfermedades concomitantes que comprometan el estado del paciente como por ejemplo infecciones urinarias, enfermedades cardíacas, renales o metabólicas, diabetes o medicaciones previas como quimioterapia o corticoides (76, 77).

La estancia hospitalaria aumenta el riesgo de adquisición de infección o colonización bacteriana. Ya desde los años 70 se sabe que el aumento del tiempo de hospitalización puede incrementar dicho riesgo desde 1% el primer día de hospitalización al 4.3% a partir de las dos semanas llegando a un 24% pasada la cuarta semana (73, 75). Se ha visto que los pacientes de unidades de cuidados intensivos están colonizados por EPCs a las dos semanas de su ingreso (78).

Las técnicas invasivas como la ventilación mecánica, la hemodiálisis, la presencia de catéteres o las intervenciones aumentan la probabilidad de ser colonizado o padecer una infección por EPCs (79–81).

El uso de antibióticos es un factor de riesgo de colonización o infección por EPCs. Existen numerosos estudios que han encontrado asociación entre la administración de carbapenem sólo o en combinación con otros antibióticos y la infección por EPCs (37, 82–85). El uso de antibióticos de amplio espectro puede destruir las bacterias sensibles que forman parte de la microbiota normal, lo que puede dar lugar a infecciones causadas por bacterias resistentes. El uso de otra clase de antibióticos como cefalosporinas, vancomicina, fluoroquinolonas o metronidazol contribuye significativamente al desarrollo de resistencias a carbapenems lo que puede generar una selección por presión antibiótica dando lugar a la aparición de bacterias resistentes.

Un estudio que evaluaba pacientes con infecciones por enterobacterias tratados con meropenem, imipenem o doripenem comparó pacientes infectados por EPCs con CMIs a



carbapenems de 2-8 mg/L con pacientes infectados por EPCs con CMIs  $\leq 1$  mg/L. Se observó que en los pacientes infectados por EPCs con CMIs de 2-8 mg/L la mortalidad era mayor y el tiempo de estancia en la UCI más largo en comparación con las cohortes con una CMIs  $\leq 1$  mg/L (81). Este estudio ha sido respaldado por otro más reciente en el que los pacientes infectados con altas CMIs a meropenem (más de 8 mg/L) tenían peor pronóstico y mayor mortalidad (86).

En un estudio retrospectivo que se realizó en el Hospital Universitario la Paz en la unidad de cuidados críticos quirúrgicos en los años 2012 y 2013 se recogieron muestras de 254 pacientes; 46 de ellos tenían EPCs y de esas, 31 (76.1%) eran productoras de OXA-48. De las KpOXAs aisladas, a 22 se les realizó el secuenciotipo y 13 (59.1%) eran ST11, 7 (31.8%) eran ST405, y 2 (9.1%) eran ST323. Los pacientes colonizados tenían mayores tasas de estancias en unidades de cuidados, cirugías abdominales, enfermedad renal, endoscopia y consumo de antibióticos (87).

Entre 2009 y 2011 se produjo un brote de EPCs que afectó al menos a 118 pacientes de un hospital holandés (88). Se estudiaron 73 de ellos en un análisis multivariante que mostró que el sexo masculino, la edad y el uso previo de fluoroquinolonas fueron factores de riesgo para la adquisición de EPCs (89).

En otro estudio multivariante del Hospital Universitario de Canarias, se analizaron los factores de riesgo de infección por *K. pneumoniae* productora de OXA-48 en pacientes colonizados. La duración de la estancia hospitalaria, la hospitalización previa, el uso de corticosteroides y la exposición antimicrobiana fueron factores de riesgo importantes de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas (90).

## 2. Epidemiología.

Existen distintas técnicas para determinar relaciones entre aislados microbiológicos para poder determinar si se trata de un brote epidémico, y en su caso identificar la fuente y las posibles vías de transmisión del patógeno. Las técnicas de referencia en el laboratorio de microbiología clínica son el estudio de restricción del ADN cromosómico mediante electroforesis de campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE), el MLST, o los métodos de *fingerprinting* mediante PCR (RAPD o REP-PCR) y con la llegada de la secuenciación de nueva generación, el análisis de genomas completos (WGS).

### 2.1. Técnicas de epidemiología.

El PFGE es una técnica con alta capacidad de discriminación. Usa enzimas de restricción con baja frecuencia de corte, el ADN cromosómico digerido es sometido a una electroforesis en el que la dirección del campo eléctrico se cambia periódicamente generando entre 10 y 30 fragmentos con un tamaño entre las 10 y las 800 kb (91). Para interpretar los perfiles suelen usarse programas informáticos como *GelCompar* o *BioNumerics* (*Applied Maths, Sint-Martens-Latem*, Bélgica). Es un método laborioso y tiene problemas de reproducibilidad que dificultan la comparación entre los resultados de diferentes ensayos.

El MLST consiste en la secuenciación de fragmentos de genes conservados (habitualmente siete). Existen bases de datos de acceso público en las que se almacenan todos los perfiles genéticos del patógeno de interés. Gracias a estas bases se puede establecer un criterio común para la tipificación y evolución de las cepas (92). Esta técnica es compleja pero permite la implementación de bases de datos de carácter mundial aunque su capacidad de discriminación es menor que la del PFGE (93).

El RAPD es una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que utiliza cebadores de aproximadamente 10 nucleótidos que con temperaturas bajas de hibridación generan amplicones de diferentes tamaños. Mediante electroforesis en gel de agarosa se obtienen perfiles de productos de amplificación que permiten diferenciar clones (94). Este método es rápido y sencillo pero poco estandarizable. Los perfiles pueden cambiar por variables como el método de extracción, el tipo de *Taq* polimerasa, la temperatura de hibridación y la concentración de magnesio (95).

Por último la REP-PCR usa cebadores que se unen a secuencias de ADN repetitivas con una longitud que puede variar entre 35 y 40pb. Es una técnica más sencilla que el PFGE pero

con menos poder discriminativo ya que los perfiles suelen tener un menor número de bandas (91). Esta técnica ha sido estandarizada y automatizada, tanto el análisis como la interpretación, por el sistema Diversilab™ (bioMérieux, Francia)(96, 97).

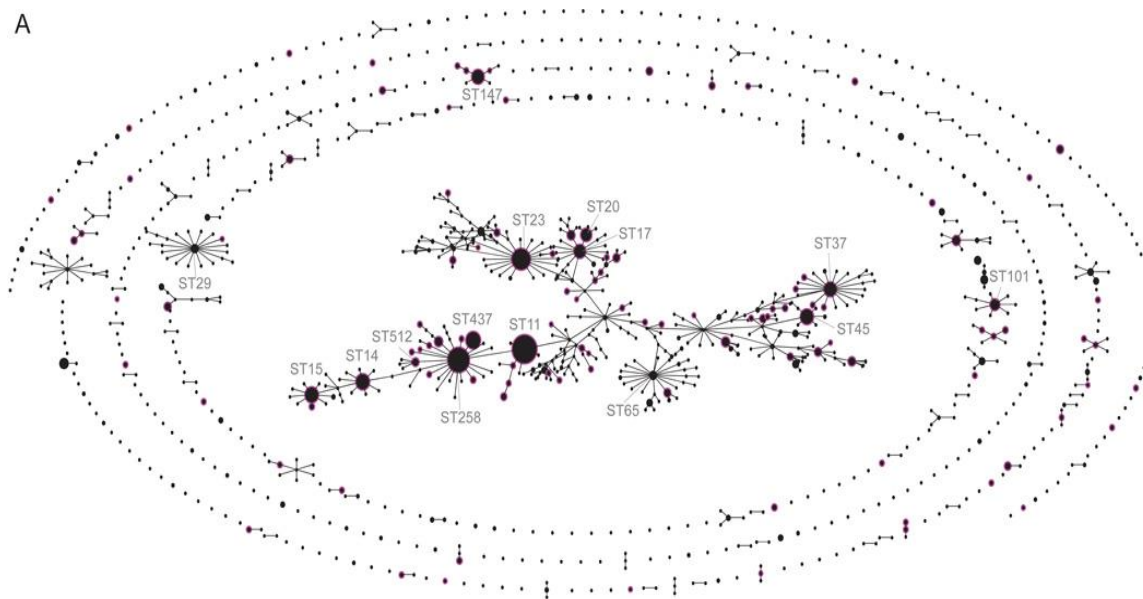
Con la llegada de los secuenciadores de alto rendimiento surge la posibilidad de analizar el genoma bacteriano completo y usarlo como herramienta epidemiológica (98, 99). La WGS es un buen método para la identificación del origen y forma de dispersión del brote porque tiene la máxima resolución posible (100).

Existen distintas plataformas para realizar WGS y aunque todas poseen químicas diferentes todas ellas necesitan de una fragmentación del ADN. Posteriormente se generan las librerías ligando a los extremos del ADN fragmentado adaptadores que actúan como cebadores para la secuenciación y además como secuencia de identificación de la muestra. Estos fragmentos se inmovilizan en una superficie sólida de manera que se pueden secuenciar en paralelo millones de fragmentos (99).

El estudio de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) definidos a partir de WGS, puede proporcionar la información necesaria para establecer relaciones entre cepas bacterianas. Puede llegarse a establecer rutas de transmisión entre hospitales o incluso entre pacientes de la misma planta (101–105). El análisis epidemiológico mediante secuenciación de genoma completo tiene mayor resolución que los métodos moleculares tradicionales (106).

## 2.1. Epidemiología de *K. pneumoniae*

Ya en 2014 había depositados más de 1500 STs de *K. pneumoniae* en la base de datos de MLST. Si se agrupan los STs que comparten al menos 6 alelos de los 7 loci aparecen 136 CCs y 528 *singletons* (STs que no comparten 6 alelos con ningún otro ST) (Figura 9). Existe un CC que comprende el 32.8% de todos los STs, el CC258.



**Figura 9:** Estructura de la población de la base de datos del MLST de *K. pneumoniae* (<http://www.pasteur.fr/mlst>) hasta 2014, representada gráficamente por eBURST v.3 (<http://eburst.mlst.net>). Se muestra la relación de los 1.536 ST de 1.924 aislamientos. Tomada de Chen et al. 2014 (107).

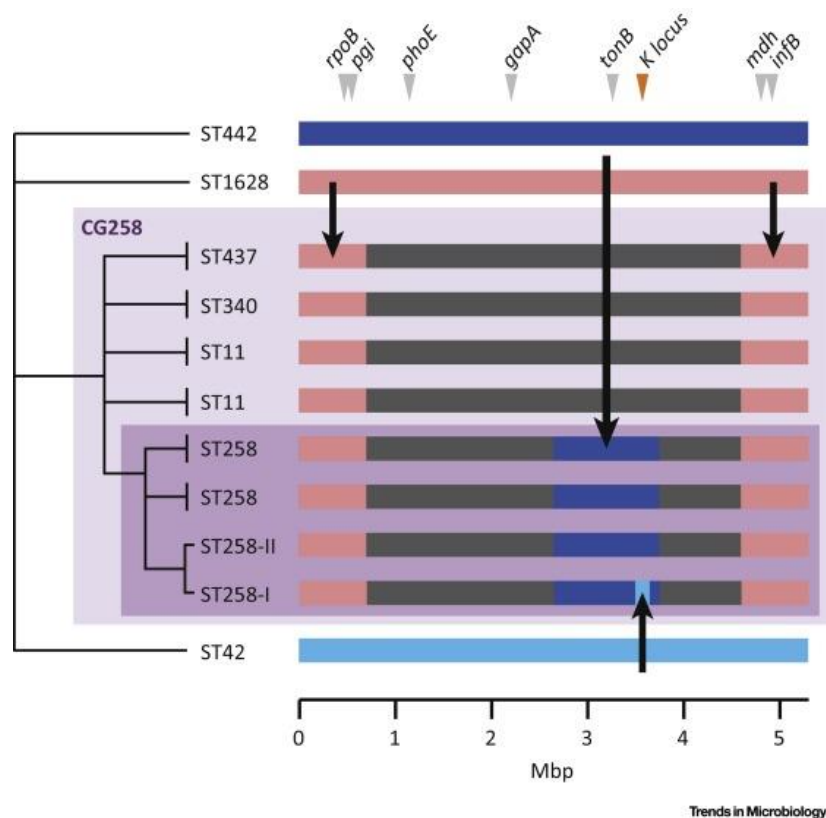
Según un análisis de más de 300 genomas completos de *K. pneumoniae*, esta especie se divide en tres especies distintas, KpI (*K. pneumoniae*), KpII (*K. quasipneumoniae*), y KpIII (*K. variicola*). Comparando genomas completos de estos tres grupos se ha visto que divergen una media de 3-4% de nucleótidos en el genoma *core* y que casi nunca recombinan por lo que pueden diferenciarse como especies que evolucionan independientemente.

El análisis de la población de 283 genomas de KpI revelaron que se ramificó en cientos de linajes (108). Este estudio en el que se realizó un análisis con fineSTRUCTURE (109) identificó recombinaciones dentro de KpI (108) aunque este hecho ya había sido observado por otros grupos (110–112).

El CC más distribuido mundialmente es el CC258, compuesto por los clones mayoritarios ST258 y ST11 y otros STs estrechamente relacionados (ST340, ST512, ST437, ST833, ST855 y ST1199). El grupo ST258 es muy amplio, incluye portadores de BLEEs y carbapenemasas, y se asocia particularmente a KPC (66, 113, 114). Por otro lado el grupo ST11

se ha visto asociado a resistencias de tipo CTX-M (115), KPC (116) y sobre todo con OXA-48 y VIM (48, 117–121).

Se ha identificado una región de 1.1Mbp en ST258 que es homogénea a ST442, mientras que el resto del genoma de ST258 se asemeja a ST11. Esto sugiere que el clon ST258 es un clon híbrido compuesto por el 80% del genoma de ST11 y el 20% del genoma de ST442 (122, 123). La región recombinante incluía el locus *K* que era distinto de ST11 lo que se asocia con un cambio de fenotipo capsular en ST258 (Figura 10)(123).

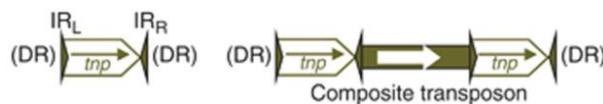


**Figura 10:** Representación de un cladograma de las relaciones del grupo CC258. Las barras de color representan el cromosoma bacteriano. Los bloques de color rosa y azul representan regiones del genoma adquiridas mediante transferencia horizontal de *K. pneumoniae* que no forma parte de CC258. Las posiciones relativas de los siete loci de *K. pneumoniae* MLST se indican mediante flechas grises. La posición del locus *K* se indica mediante una flecha naranja. Tomada de Kelly et al. 2016 (123).

### 3. Elementos de inserción

Los elementos transponibles son elementos esenciales en la evolución del genoma bacteriano (124) facilitando la adaptación a ambientes específicos (125), por ejemplo aumentando la velocidad de crecimiento (126), aunque la mayoría de eventos de transposición producen el efecto contrario reduciendo las tasa de crecimiento (127). Se estima que la tasa media de transposición es de aproximadamente  $1.15 \times 10^{-5}$  por elemento y por generación aunque varía para cada elemento (128). Los elementos de inserción clásicos o transposones simples, están flanqueados por repeticiones directas (DR) o indirectas (IR). Estas secuencias, normalmente, se encuentran entre un gen o varios que codifican para una transposasa. Estas repeticiones son reconocidas por la transposasa lo que permite su movilización a una nueva región del genoma. Esta movilización puede darse dejando una copia de la estructura en su localización inicial o trasladando el complejo.

Aunque en general los IS no transportan genes de resistencia son capaces de transponerse de dos en dos actuando como una unidad, que actúa movilizandolos genes flanqueados por los IS, transposón compuesto. Esto ocurre, por ejemplo, en el caso de *ISEcp1* que está asociado a la movilidad de genes de resistencia debido a que no se reconoce la DR que se encuentra después del gen de la transposasa siendo la siguiente DR la que se reconoce y actúa como una unidad de transposición (129, 130) (Figura 11).



**Figura 11.** Estructura de los elementos de inserción y del transposón compuesto.

IRL e IRR: repeticiones invertidas izquierda y derecha; DR: repeticiones directas. Tomada de Partridge et al. 2011 (124)

Los Transposones de DNA o Clase I se mueven por el genoma usando la transposasa o los retrotransposones o Clase II se mueven siendo transcritos a RNA y después a DNA mediante una retrotranscriptasa.

## 3.1. Elementos de inserción en KpOXA-ST11.

Se ha secuenciado el genoma de KpOXA-ST11 identificándose varios elementos de inserción:

### 3.1.1. *ISEcp1*

*ISEcp1* forma parte de la familia de *IS1380* tiene un tamaño de aproximadamente 1.5Kb y está flanqueado por IR de 14pb. Este IS utiliza secuencias parecidas a estos IR para movilizar regiones adyacentes, creando duplicaciones de 5 pb de la secuencia flanqueante en la transposición (129, 131–134). La variabilidad del tamaño de *ISEcp1* viene dada por la distancia de los IR adyacentes (134).

Se ha encontrado *ISEcp1* asociado a *bla*<sub>CTX-M-3</sub> en *pK29* (EF382672) y a *bla*<sub>CTX-M-62</sub> en *pJIE137* (EF219134). En algunos plásmidos de tipo *IncA/C* se han visto regiones de *bla*<sub>CMY-2</sub> duplicadas y asociadas a copias completas y parciales de *ISEcp1* (135–137).

### 3.1.2. *IS26*.

*IS26* está asociado a regiones de multirresistencia (MRR) y suelen encontrarse más de 10 copias en los plásmidos. Tiene un tamaño de unos 820pb que codifica para una única transposasa. Tiene un IR de 14pb y genera un DR de 8pb. Este IS genera cointegrados de el mismo debido a que la transposición viene acompañada de replicación y de recombinación homóloga (124).

Este elemento de inserción suele estar asociado genes de resistencia a aminoglicósidos como *aphA1a* y *b*, *nmpA*, a genes de carbapenemasas como *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CMY-13</sub>, a resistencias a tetraciclinas por *tetA(C)*, *tetA(D)* y *catA2b* (124).

### 3.1.3. *ISKpn1*.

*ISKpn1* tiene un tamaño de 1445pb y pertenece a la familia de *IS3*. Los *IS3* representan el grupo de secuencias de inserción más ampliamente extendido a pesar de la diferencia en la composición AT/GC de los elementos y del anfitrión (138–140). Esta familia de IS tiene más de 20 miembros diferentes identificados en bacterias gram-negativas (141). Todos ellos comparten características en común como similitudes en los IR o la presencia de dos marcos de lectura (ORF) en la fase 0 y -1 (*orfA* y *orfB*) que dan lugar a las preproteínas OrfA y OrfB (140, 142).



OrfA y OrfB son un inhibidores de la transposición, al igual que la transposasa poseen un dominio HLH (*helix-loop-helix*) que reconoce los IR (139). Por lo tanto OrfA y OrfB compiten con la transposasa para unirse a los IR dando como resultado la inhibición de la formación del transpososoma lo que resulta en un nivel bajo de la transposición (143, 144).

*ISKpn1* está relacionada con *IS1397* e *IS150* y al igual que ellas también se inserta específicamente en unidades palindrómicas y comparte características con ellos como la producción de OrfA y OrfB. *ISKpn1* tienen secuencias palíndromicas que forman un lazo (*loop palindromic units*, PU) con un alto contenido en GC y que son específicas de *K.pneumoniae*. *ISKpn1* se inserta en la parte central de las PU generando una duplicación de 3 pb. El extremo C-terminal de OrfA en *ISKpn1* tiene un motivo conservado de 13 aminoácidos, ELRYLRAENAYLK que parece seleccionar las PU como zonas de transposición. (145).

#### **3.1.4. *ISKpn14***

*ISKpn14* pertenece a la familia de *IS1*. Es uno de los elementos de inserción más pequeños con 768 pb. Fue de los primeros en ser identificado en bacterias. Por lo general produce DR de 9 pb aunque también se han visto de 8, 10 y 14 pb (146, 147). *IS1* posee dos ORF que producen InsA o InsB dependiendo del marco de lectura. Como consecuencia se produce una proteína de fusión, InsAB', de la unión de las subunidades InsA e InsB que da lugar a la transposasa.

La proteína InsA se une a los DR reprimiendo su propio promotor y el de la transposasa (148, 149). *IS1* se transpone a baja frecuencia debido a una regulación a nivel de traducción. La frecuencia de transposición de *IS1* parece ser determinada principalmente por la relación de InsAB' con InsA (150).



# Objetivos

## Objetivos:

- Caracterizar la diversidad y la estructura genética de la población de *Klebsiella pneumoniae* ST11 productora de carbapenemasa OXA-48 del Hospital Universitario La Paz mediante secuenciación genómica.
- Desarrollar un protocolo para determinar directamente la localización genómica de los elementos de inserción mediante secuenciación masiva dirigida.
- Estudiar la movilidad de los elementos de inserción en los genomas secuenciados y utilizarla para aumentar la resolución de la estructura poblacional.

# Material y métodos



# 1. Contexto hospitalario y selección de muestras biológicas

Para este estudio se utilizaron aislados clínicos de *K. pneumoniae* productores de OXA-48 y de secuenciotipo ST11 procedentes en su gran mayoría del HULP, con una pequeña representación del Hospital 12 de Octubre (H12O).

## 1.1. Hospital Universitario La Paz

El Hospital Universitario La Paz está situado al Norte de la Comunidad de Madrid con una capacidad que supera las 1300 camas y que ofrece servicio a unos 600.000 habitantes. El complejo está compuesto por cuatro núcleos: Hospital General, Hospital Maternal, Hospital Infantil y el Hospital de Traumatología y Rehabilitación; existe además un centro situado a 15km con alrededor de 150 camas, el Hospital de Cantoblanco, que ofrece servicios de cirugía general, geriatría, medicina interna, cirugía ortopédica, rehabilitación y neumología. Además de estos núcleos, el hospital tiene adscritos tres centros de atención ambulatoria especializada y 30 centros de atención primaria, y desde el año 2014 se incorporó al complejo el Hospital Carlos III. El Hospital Universitario La Paz tiene unos 48.000 ingresos y 400.000 estancias al año. Además, anualmente las consultas externas reciben 1.242.000 visitas, 285.000 en urgencias, se realizan 46.000 operaciones quirúrgicas, 150 trasplantes de órgano sólido, y se atienden 10.000 partos.

## 1.2. Hospital Universitario 12 de Octubre

El Hospital Universitario 12 de Octubre tiene su emplazamiento al Sur de Madrid, dispone de unas 1300 camas y consta de tres núcleos: la Residencia General, el hospital Materno-Infantil y el Centro de Actividades Ambulatorias. Además cuenta con tres centros de especialidades, dos helipuertos y un edificio técnico de instalaciones. Al igual que el Hospital Universitario La Paz, atiende a una población de unos 600.000 habitantes y tiene unos 42.000 ingresos por año.

## 1.3. Selección de muestras biológicas

Para este trabajo se seleccionó una colección de aislados de *K. pneumoniae* productores de OXA-48 y pertenecientes al secuenciotipo ST11 (KpOXA-ST11) obtenidos en el HULP, recogiendo, de manera retrospectiva los casos, ya sea de muestras clínicas o de colonización. Las muestras pretenden abarcar varios orígenes biológicos en un periodo de 3 años y en diversos edificios, plantas y servicios del Hospital Universitario La Paz.

Los aislados clínicos y de colonización fueron obtenidos de del cepario del Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica dónde se almacenaban a -80°C y se recogieron los datos de origen de la muestra, servicio de procedencia, y fecha de aislamiento. Las localizaciones se identificaron según los códigos de unidades funcionales empleados en el hospital. En este estudio no se registraron datos de los pacientes, aunque se utilizó el número de historia clínica para asegurar que solo se recogía un aislado por paciente. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz, expediente P-1669.

Los aislados clínicos se obtuvieron y procesaron en el Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica del HULP que facilitó los siguientes datos:

- Identificación bacteriana que se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight*).
- Estudios de sensibilidad a antibióticos realizados mediante los sistemas automáticos Vitek 2 (bioMérieux) ó Wider (Francisco Soria Melguizo) y categorizados según los criterios de *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (151).
- Confirmación fenotípica de producción de carbapenemasa mediante la realización del test de Hodge modificado usando discos de ertapenem, meropenem e imipenem.
- Detección genotípica de gen de carbapenemasa tipo OXA-48 mediante PCR a tiempo real (Anexo 1).
- Tipado molecular mediante una PCR a tiempo real diseñada en el servicio para identificar el clon ST11 (152).

Con respecto a las muestras cedidas por el Hospital 12 de Octubre, los datos microbiológicos de identificación bacteriana, secuenciotipo y genes de resistencia fueron proporcionados por el Servicio de Microbiología de dicho hospital.



## 2. Medios de cultivo y extracción de ADN

Los aislados se sembraron en placas de Agar Columbia + 5% sangre de cordero (bioMérieux). Una colonia de cada placa se resuspendió en 5 ml de medio LB líquido (1:100 p/v de Triptona; 0.5:100 p/v de Extracto de Levadura; 1:100 p/v de NaCl) y se incubó a 37°C en agitación fuerte durante la noche. Para la extracción de ADN total se recogió 1.5 mL de cultivo bacteriano y se centrifugó durante 10 min a 4000 rpm.

El ADN total se extrajo utilizando el *kit* comercial *DNA Isolation Kit for Cells and Tissues* (Roche Diagnostics). Se trata de un *kit* de extracción en el cual se lisan las células mediante un tampón de lisis que contiene un detergente aniónico potente suplementado con proteinasa K. Posteriormente se tratan las muestras con RNAsa para eliminar el RNA y mediante una precipitación y centrifugación selectiva se eliminan las proteínas. El ADN purificado es recuperado finalmente mediante precipitación con isopropanol. La ventaja de este tipo de extracción frente a otros métodos, tanto manuales como automáticos, reside en las características de la muestra, ya que los aislados KpOXA-ST11 tienden a ser muy mucosos lo que suele provocar atascos y bloqueos en estos sistemas o en otros de tipo columnas de sílice. Por otro lado el ADN extraído mediante este método cumple los requisitos de calidad y cantidad necesarios para ser usado en secuenciación masiva. La purificación se realizó según el protocolo propio del *kit* escalando las cantidades de reactivos para adaptarlo a la extracción de 1.5mL de cultivo.

El ADN se cuantificó por fluorescencia utilizando el *kit Quant-iT™ ds BR* (Invitrogen). Aquellas muestras que no alcanzaban una concentración de ADN de 100ng/μl se descartaron y se repitió la extracción hasta obtener las concentraciones mínimas requeridas.

Los geles de agarosa utilizados durante el estudio se hicieron en TAE 1X (1% Agarosa D1 Low EEO-GQT, Pronadisa). El tampón TAE 1X se obtuvo a partir de una dilución de tampón TAE 50X (242g/L Tris Base, 57.5ml/L acético glacial, 100ml/L EDTA pH 8)(153).

## 3. Estructura fina de la población de KpOXA-ST11

El grueso de este trabajo reside en el análisis de 97 aislados de KpOXA-ST11. Los aislados se secuenciaron en la empresa *Eurofins Genomics* con un secuenciador Illumina HiSeq 2500 con lecturas paired-end (2x125) de fragmentos de ADN de unos 550pb usando el kit HiSeq SBS v4.

### 3.1. Ensamblaje de la cepa de referencia: Kp2.

Para disponer de un genoma completo que se pueda utilizar como referencia para mapear el resto de muestras y buscar SNPs, se secuenció mediante la tecnología Illumina, un aislado de KpOXA-ST11 que fue aislada de un hemocultivo en 2014, y llamado Kp2. Además esta muestra fue secuenciada por la tecnología de Roche, Junior 454 (INGEMM, Hospital La Paz), para comparar la eficiencia de la captura de híbridos con la secuenciación de genomas completos tanto por Illumina como por Junior 454.

La muestra se obtuvo del servicio de Urgencias del Hospital General y tanto el cultivo como la extracción de ADN se realizaron como se ha descrito anteriormente.

Para la secuenciación del genoma completo mediante Junior 454 e Illumina se usaron librerías de tipo *shotgun* en las que se rompe el ADN de manera aleatoria en pequeños segmentos solapantes que luego se usarán para ensamblar las secuencias mediante programas informáticos.

Para el análisis de la carrera con Illumina se ejecutó un ensamblaje de *novu* usando el programa *Geneious 9.0*. Mientras que en la carrera con Junior 454 se usó el programa *Newbler 3.0 de Novo Assembler* (Roche Diagnostics).

La anotación de los ensamblajes de Kp2 se llevó a cabo con *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>), y la detección de genes de resistencia con ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). Las mutaciones cromosómicas de resistencia a antibióticos se analizaron comparando los genes candidatos con las secuencias disponibles en las bases de datos públicas mediante BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)



## 3.2. Preparación de las secuencias y mapeo de SNPs

Para poder realizar un análisis de polimorfismos se generó un *pseudogenoma* a partir de las secuencias obtenidas mediante el sistema de Illumina. Para ello se ensamblan las secuencias y se concatenan los *contigs* excluyendo los plásmidos. Se generó un ensamblaje rápido con *Geneious 9.0* que dio lugar a unos 50 *contigs*. Éstos se utilizaron para hacer una búsqueda en *Genbank* mediante BLAST. En ésta búsqueda se identificaron fragmentos con similitud a dos plásmidos, *pOXA48* y *pKPN-68a-like*.

1. Se utilizó el programa *Bowtie2*, para realizar el mapeo de las lecturas de Kp2 frente a la secuencia del plásmido *pOXA* (código de acceso a *Genbank*: JN626286) y se obtuvo un único *contig* que abarca todo el plásmido.
2. El fichero de las lecturas no incluidas en el *contig* anterior ("*unused reads*") se mapeó frente a *pKPN-68a-like* (código de acceso a *Genbank*: CP009777).
3. Con las lecturas no utilizadas ("*unused reads*") se realizó un ensamblaje de *novo* usando el programa *Geneious 9.0*.
4. Del ensamblaje se extrajeron los 45 *contigs* que poseían una cobertura >30 y se exportaron en formato fasta. Los demás *contigs* se descartaron por baja cobertura.
5. Los *contigs* extraídos se utilizaron para hacer una búsqueda en la base de datos *GenBank* mediante *BLAST*. Se identificaron así 6 *contigs* más, con tamaños entre 2392 y 5581 pb, con similitud a plásmidos.
6. Se consideró que los 39 *contigs* restantes tenían una alta probabilidad de ser cromosómicos. Se importaron de nuevo a *Geneious 9.0* y se concatenaron arbitrariamente en una única secuencia "*pseudocontig o pseudocromosoma*" que se utilizó como referencia para buscar SNPs. Es importante subrayar que el orden de concatenación fue arbitrario, no se corresponde con ningún ensamblaje real y las coordenadas de los SNPs sólo tienen validez en referencia a este pseudocromosoma.

Para establecer las relaciones filogenéticas que existen entre los distintos aislados de KpOXA-ST11 se realizó un análisis de SNPs:

1. Se hizo un mapeo de las lecturas obtenidas de cada uno de los aislados frente al pseudocromosoma de referencia.
2. Se hizo una búsqueda de SNPs utilizando como criterios una cobertura mínima de al menos el 80% de la cobertura media de la cepa y un mínimo del 98% de coincidencia en todas las secuencias.
3. Se construyó una secuencia artificial concatenando todos los SNPs para poder realizar un alineamiento y un árbol filogenético con el programa MEGA7 con el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura-Nei (154). El árbol consenso se ha generado mediante el método de *bootstrap* utilizando 500 repeticiones (155).

## 4. Elementos móviles y genes de resistencia a antibióticos en KpOXA-ST11

Para identificar los elementos móviles y genes de resistencia se realizaron búsquedas de los elementos móviles en las bases de datos *ISFinder* y *Plasmidfinder* de Kp2 y los genes de resistencia en *Resfinder*. Además, en un análisis preliminar se observó alguna variación entre aislados que sugería la presencia de algún plásmido adicional en algunos aislados. Se hizo por lo tanto una búsqueda de plásmidos en Kp1, y se identificó un plásmido de tipo *IncR* que no estaba presente en Kp2.

Para hacer una estimación del número de copias de los diferentes elementos móviles y genes de resistencia se eligieron como normalizadores genes esenciales conocidos que presentan copia única en el genoma. Los genes que se han elegido son:

- ***atpA***: gen que codifica la subunidad  $\alpha$  de la sección FO de la ATP sintasa, enzima capaz de producir la síntesis del adenosín trifosfato (ATP) a partir de adenosín difosfato (ADP) y un fosfato inorgánico (Pi). Localizado en el operón de la ATP sintasa.
- ***ftsZ***: gen que codifica una proteína esencial del proceso de división celular bacteriana, localizado al final del grupo de genes *dcw*.
- ***mraW***: gen que codifica una metiltransferasa del ARNr 16S, localizado al principio del grupo de genes *dcw*. La distancia entre los genes *mraW* y *ftsZ* es de 16 Kb aproximadamente.

Además se utilizaron los genes de los rRNA 16S y 23S (8 copias por genoma en *K. pneumoniae*(156)) como controles.

El número de copias de ISs, genes de resistencia y plásmidos se calculó de la siguiente manera:

1. Para cada aislado de KpOXA-ST11 se realizó un mapeo sobre un fichero conteniendo las secuencias de los genes normalizadores, los ISs, los genes de resistencia identificados en Kp1 y Kp2, y las secuencias identificadoras de los plásmidos obtenidas de *PlasmidFinder* (secuencias *Inc*).
2. Se anotó la cobertura o profundidad media (número de reads en cada posición (nucleótido) dividido por la longitud de la secuencia) de los genes normalizadores y se hizo una media ponderada de los tres para dar la cobertura media correspondiente a una copia por genoma.
3. El número de secuencias que se obtuvo para cada IS, gen o plásmido, se dividió por la media ponderada de los genes normalizadores, el resultado es el número de copias por genoma.

Además se localizaron las posiciones de los ISs para comprobar su utilidad para mejorar la resolución de las filogenias de SNPs, o para resolver relaciones ambiguas o de baja resolución. El interés de las variaciones de posición reside en que identifican sin ambigüedad a todos los aislados con un antecesor común reciente. Para ello, se localizaron las distintas secuencias que aparecen por tipo de IS y se identificó en cada cepa el número y lugar de inserción de cada IS:

1. Se extrajeron informáticamente las lecturas que contenían las secuencias de los extremos de los ISs (Anexo 2), para ello se utilizó un *script* en *Perl* diseñado para este propósito (colaboración con Paulino Gómez-Puertas y Biomol Informatics, S.L.).
2. Se ensamblaron las lecturas con el programa *Geneious* 9.0 (*Medium sensitivity*) generando tantos *contigs* como copias del IS en el genoma.
3. Se realizó un mapeo local de los *contigs* contra Kp2 para localizarlos.
4. Aquellos *contigs* que no se encontraban en el genoma de Kp2 se buscaron en *Genbank* mediante BLAST.

## 5. Captura de híbridos

Con el objetivo de analizar de manera selectiva los elementos móviles del genoma se desarrolló un protocolo de captura de secuencias o híbridos paralelamente a la extracción informática de secuencias de interés a partir de genomas completos. Para este estudio se seleccionaron 11 aislados de KpOXA-ST11.

La captura de híbridos pretende realizar una amplificación selectiva de regiones de interés en el ADN para aumentar el rendimiento de la secuenciación masiva. Si solo se secuencian las regiones que se desean estudiar, la cobertura de las secuencias se verá aumentada, lo cual permite tener un análisis con mayor profundidad o aumentar el número de muestras incluidas en cada carrera de secuenciación.

En la captura de híbridos se desconoce la región que se va a secuenciar, ya que la zona de interés se encuentra flanqueando los IS, con lo cual no se puede diseñar una PCR específica que se dirija a esas regiones debido a que la zona donde se han insertado es variable y distinta para cada aislado.

### 5.1. Preparación del ADN

Para poder diseñar una PCR que permita amplificar las regiones colindantes a los elementos de inserción se necesita conocer una secuencia que se encuentre más o menos próxima a esa zona para que se puedan hibridar los cebadores. Para solventar este problema se procede a la digestión con una enzima de restricción que genere extremos cohesivos, en este caso *Bam*HI (Tabla 1) que tiene un sitio de reconocimiento G<sup>A</sup>GATCC y corta después de la primera guanina.

REACTIVOS (concentración final)	Condiciones
500ng de ADN	37°C 1hora
Buffer 1x	
10U enzima <i>Bam</i> HI ( <b>BAMHI-RO ROCHE</b> )	60°C 15min
Hasta 10µl de H <sub>2</sub> O	

**Tabla 1:** Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la digestión con *Bam*HI

Gracias a los extremos cohesivos que se han generado con *Bam*HI se pueden diseñar unos adaptadores que se acoplen a esas regiones. Los adaptadores (Tabla 2) son dos

oligonucleótidos complementarios que se van a unir generando extremos cohesivos con los del ADN digerido por *Bam*HI.

Nombre Adaptador	Secuencia del adaptador 5'-3'
<b>Adapter Short</b>	CAGCGCACATCG
<b>Adapter Long</b>	GATCCGATGTGCGCGTG

**Tabla 2:** Secuencia de adaptadores

Para generar los adaptadores de doble cadena con un extremo protuberante que posteriormente se ligarán con el ADN se usan 2µg de cada adaptador junto con 6µl de *PyroMark Annealing Buffer* (Qiagen) se calentó a 95°C 15min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La reacción que se genera se denomina ADAPTER MIX.

Para que los adaptadores puedan unirse a los extremos del ADN bacteriano digerido, la ligasa necesita un fosfato libre en el extremo 5' ya que se va a formar un enlace fosfodiéster entre el fosfato 5' del donante y el hidroxilo 3' del receptor, por esta razón es necesario fosforilar los dímeros de adaptadores. La reacción de fosforilación (Tabla 3) se llevó a cabo mediante la enzima Polinucleótido Kinasa (PNK). La reacción que se genera se denomina PNK MIX.

REACTIVOS (concentración final)	Condiciones
ADAPTER MIX 3µl	25°C 20min
ATP 1mM	
1U enzima PNK	72°C 20min
Buffer 1x	
Hasta 10µl de H <sub>2</sub> O	

**Tabla 3:** Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la fosforilación con PNK

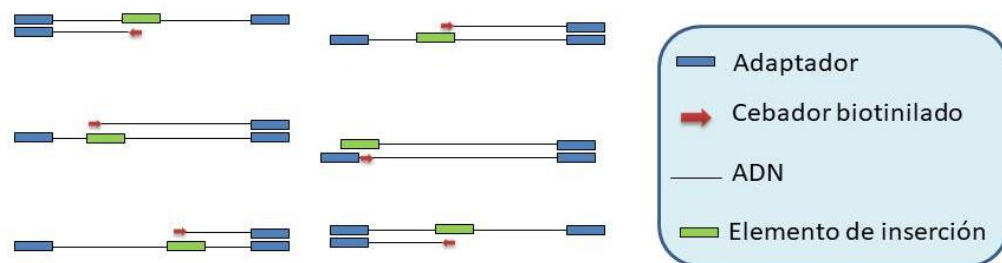
Para poder diseñar un cebador que se una a la zona donde se ubica el elemento de inserción se necesita una secuencia conocida en los extremos que se han generado al digerir con la enzima *Bam*HI. Por eso se fusionan los adaptadores ya fosforilados con el ADN digerido usando la enzima LIGASA (Tabla 4).

REACTIVOS (concentración final)	Condiciones
ADN digerido con <i>Bam</i> HI 1µl	16°C Toda la noche
PNK MIX 2µl	
1U enzima LIGASA	
Buffer 1x	
Hasta 20µl de H <sub>2</sub> O	

**Tabla 4:** Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la ligación de adaptadores y ADN

## 5.2. Enriquecimiento en las zonas colindantes a los IS

El siguiente paso es realizar una copia sin amplificación de las regiones colindantes a los elementos de inserción, para ello se usan cebadores que se unen a los extremos de los IS pero que se encuentren orientados hacia el exterior, como cebador en el extremo contrario se usa la secuencia complementaria a los adaptadores que se han ligado en los extremos cohesivos que *Bam*HI había generado. De este modo se obtienen fragmentos de distinto tamaño, dependiendo de la distancia del elemento de inserción a la secuencia de reconocimiento de la enzima *Bam*HI (Figura 12).



**Figura 12:** Esquema de la reacción de captura de híbridos.

Este proceso ha sido denominado como “captura de híbridos” ya que el objetivo es realizar una copia de las zonas flanqueantes a los elementos de inserción para después desnaturalizar el ADN y deshacerse del resto del genoma.

En esta PCR (Tabla 5) se usan cebadores (Tabla 6) que amplifican los cuatro tipos de elementos de inserción identificados en KpOXA-ST11. Para cada tipo de IS se diseñaron dos cebadores que se unen a los extremos 5' y 3' del IS, pero en este caso no se dirigen a la zona interna del IS si no hacia las zonas exteriores. Este proceso no incluye un cebador complementario que debería unirse al adaptador unido al extremo digerido por *Bam*HI, ya que lo único que se pretende es copiar estas zonas flanqueantes al IS incluyendo, además, la secuencia del adaptador para en un paso posterior proceder a la amplificación de estas secuencias.

REACTIVOS (concentración final)	Condiciones
Producto de ligación de ADN y adaptadores 5 µl	95°C 4 min
Premix Ex Taq™ Perfect Real Time (Takara Bio Inc.) 1x	94°C 30s
Cebador biotinilado 1µM de cada uno	50°C 30s x10
Hasta 50µl de H <sub>2</sub> O	72°C 2 min
	72°C 10 min

**Tabla 5:** Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la captura de híbridos.

Nombre cebador	Secuencia del cebador 5'-3'
<b>Bio-ISEcp1-5p</b>	Bio-AAGCTGAATTTGAAGGAATGC
<b>Bio-ISKpn14-5p</b>	Bio-ATTACGCATCACGCCTTCAG
<b>Bio-ISKpn1-5p</b>	Bio-TGTTCTCCGTCTTACCGG
<b>Bio-IS26-5p</b>	Bio-CACAGAATGATGTCACGCTG
<b>Bio-ISEcp1-3p</b>	Bio-TGCTCTGTGGATAACTTGACG
<b>Bio-ISKpn14-3p</b>	Bio-TCGGTGGAGCTGCATGAC
<b>Bio-ISKpn1-3p</b>	Bio-CAACGAGCGGATAAGCCTG
<b>Bio-IS26-3p</b>	Bio-TGCACTACGCAAAGGCCAG

**Tabla 6:** Secuencia de cebadores biotinilados para captura de híbridos.

Para obtener ADN monocatenario se une el ADN sintetizado, que está biotinilado en un extremo, a partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Strep-MBs), se desnaturaliza el ADN lavando las partículas con una solución alcalina y se elimina la cadena no biotinilada (que se ha desprendido de las partículas) mediante lavados. Esta desnaturalización y captura permite, además, eliminar el resto del genoma bacteriano. A continuación se expone el protocolo en detalle:

1. Se lavan 25 µl de Strep-Mbs tres veces con citrato de sodio salino (SSC) 0.5x (75mM de NaCl+7.5mM de citrato de sodio) utilizando una gradilla con un imán para separar las partículas de la fase líquida.
2. Una vez se lavan las Strep-Mbs se mezclan con los 50 µl de la reacción de PCR de captura de híbridos y se dejan 5 min a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante.
3. Con las partículas en el imán, se lava una vez con 100µl de etanol absoluto durante 20 segundos.



4. Para desnaturalizar el ADN se añaden 100µl de NaOH 0.1M, se incuba 20s y se coloca en el imán para retirar el NaOH.
5. Se lavan las partículas tres veces con 100µl de tampón de lavado Tris-acetato pH 7.8.
6. Se añaden 15µl de Tris-EDTA 1x (10mM Tris-HCl + 1mM EDTA·Na<sub>2</sub>) para resuspender las Strep-MBs que llevan unidas las cadenas sencillas de ADN que se han capturado.

### 5.3. Amplificación de híbridos.

Una vez que se dispone de las regiones contiguas a los IS purificadas se realiza una PCR para amplificar estas zonas. Como los híbridos están unidos a las Strep-MBs los primeros ciclos de amplificación se realizarán sobre las propias partículas magnéticas (Tabla 7), después el proceso continúa como en una PCR convencional en la cual como cebador complementario al que hibrida con el IS se usa una secuencia diseñada para hibridar con los adaptadores. Los cebadores que se usaron fueron los mismos que en la sección de captura (Tabla 6) pero en este caso sin biotinilar. Como cebador complementario se usó el Adaptador S2 (CACGCGCACATCGGATC).

REACTIVOS (concentración final)	Condiciones
Producto de ligación de ADN y adaptadores 5 µl	95°C 4 min
Premix Ex Taq™ Perfect Real Time (Takara Bio Inc.) 1x	94°C 30s
Cebador de IS 0.5µM de cada uno	50°C 30s x30
Cebador Adaptador S2 2µM	72°C 2 min
Hasta 50µl de H <sub>2</sub> O	72°C 10 min

**Tabla 7:** Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación de híbridos.

A continuación para purificar los productos de PCR que han amplificado desde el IS hasta la secuencia diana de *Bam*HI se usó *Optima DTR™ (Dye Terminator Removal) 96-Well Plate Kit* (EdgeBIO). Se trata de una resina capaz de separar los amplicones de dNTPs, cebadores y fragmentos por debajo de 20pb mediante exclusión molecular. Está especialmente diseñado para limpiar reacciones para secuenciación de Sanger, en este caso además sirve para eliminar el resto de Strep-Mbs:

1. Se centrifugó la placa para deshidratar la resina 3min a 1200 x g.
2. Se añadieron los 50 µl de PCR de amplificación de híbridos.
3. Se centrifugó 5min a 1200 x g y se recogió el eluido purificado.
4. Para cuantificar se volvió a usar el *kit Quant-iT ds BR™* (Invitogen™) según requiere el manual.

## 5.4. Preparación de librerías y NGS

La secuenciación de híbridos capturados se realizó utilizando el sistema GS Junior 454 de Roche (INGEMM, Hospital La Paz). Este tipo de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) permite obtener lecturas de unos 400pb, suficientemente largas para identificar las zonas adyacentes a los ISs seleccionados. La cobertura para las reacciones de tipo *shotgun* es de unas 120.000 secuencias, lo cual permite realizar carreras con varias muestras gracias al uso de secuencias de reconocimiento (RL) que se incluyen en la generación de las librerías.

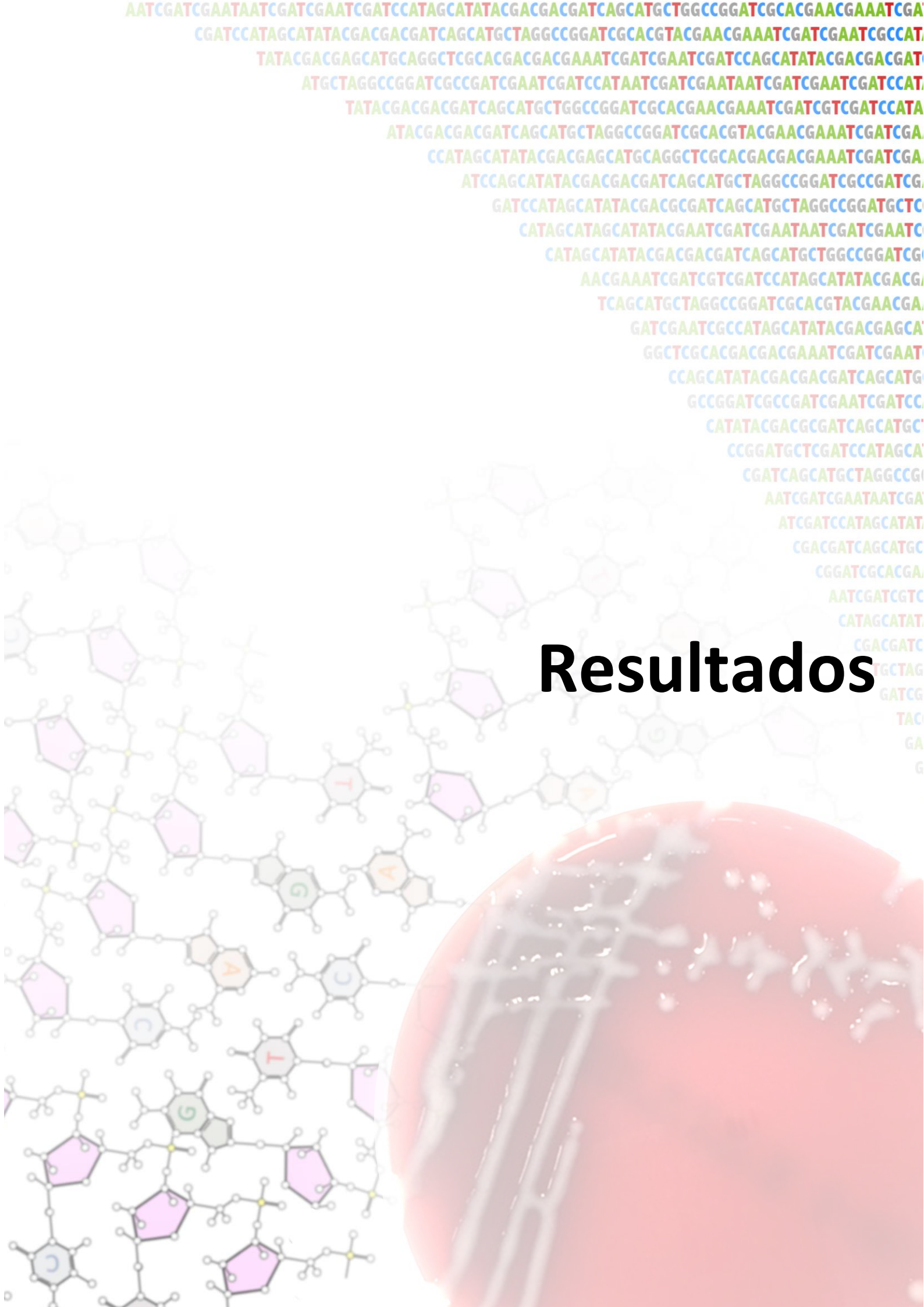
Para generar las librerías que se usaron en la NGS de elementos de inserción se utilizó el kit de Roche *GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit*. En este caso, no es necesario fragmentar el ADN de manera aleatoria ya que las regiones de interés han sido previamente seleccionadas y amplificadas como se ha descrito, por eso, para la generación de la librería de los híbridos capturados y purificados se pasó directamente al punto en el cual se procede a la reparación de los extremos del ADN. A partir de aquí se continuó el proceso tal y como recomiendan los protocolos de Roche.

## 5.5. Análisis de híbridos

Para el análisis informático se usó el programa *BioEdit* que permite hacer alineamientos, búsqueda y edición de secuencias. Cada muestra se analizó de forma independiente:

1. Se separaron las secuencias en las distintas muestras según los identificadores que aparecen en los adaptadores RL que se colocan en los extremos al generar las librerías.
2. Se identificaron aquellas secuencias que incluyen los cebadores de los distintos IS, si una secuencia no incluye el cebador es desechada y considerada como ruido.
3. Se separaron las secuencias por IS.
4. Se analizaron las posiciones de inserción de *ISKpn1* e *ISEcp1* en las distintas cepas y se compararon con las obtenidas informáticamente de secuenciación de genomas completos.

# Resultados



# 1. Estructura fina de la población de KpOXA-ST11

Se analizaron los genomas de 97 cepas de KpOXA-ST11 de distintos pacientes mediante la tecnología de Illumina, además una de ellas se secuenció también mediante el sistema GS Junior 454 (ROCHE) (Kp2).

Para escoger las muestras que fueron secuenciadas se hizo una selección de 35 cepas de KpOXA-ST11 que se encontraban distribuidas por todo el complejo hospitalario y otra selección de 32 muestras también de KpOXA-ST11 que se aislaron en la unidad G02C en la que se encuentra el servicio Cirugía Vascular y Neurocirugía, aunque todas las muestras recogidas pertenecen a Cirugía Vascular, y otras 25 muestras concentradas en la unidad G08C en la que se encuentra el servicio de Nefrología:

- Se recogieron aislados procedentes de muestras de colonización (64 muestras rectales) y de infección (absceso abdominal: 2 muestras, aspirado bronquial: 1, esputo: 1 muestra, faríngeo: 1 muestra, hemocultivo: 13 muestras, herida quirúrgica: 2 muestras, orina: 6 muestras, úlcera cutánea: 2 muestras).

- Las muestras seleccionadas correspondían al período de abril de 2012 a mayo de 2015 (2012: 12 muestras, 2013: 43 muestras, 2014: 32 muestras, 2015: 5 muestras).

- La mayoría de muestras pertenecían al Hospital General del complejo hospitalario La Paz, pero también se seleccionaron muestras del Hospital Infantil, Hospital de Rehabilitación y Traumatología, Hospital de Cantoblanco y Hospital Maternal.

Además se incluyeron 5 muestras de KpOXA-ST11 pertenecientes al Hospital Universitario 12 de Octubre: 2 exudados inguinales, 1 esputo, 1 orina y 1 aspirado bronquial. Las muestras datan de Agosto de 2013 a Octubre de 2015 (2013: 1 muestra, 2014: 1 muestra, 2015: 3 muestras).

## 1.1. Ensamblaje de la cepa de referencia: Kp2

La secuenciación del genoma completo que se realizó mediante Junior 454 resultó en un total de 195.891 secuencias que fueron ensambladas mediante el programa *Newbler 3.0* de 454 *Life Sciences Corporation*, ROCHE. Como resultado se obtuvieron 98 *contigs* con una N<sub>50</sub> de 189.271 nucleótidos ordenados en 58 *scaffolds* con una estimación de tamaño del genoma de

6.3 Mb. Con el sistema Illumina se obtuvieron 2.776.100 x 2 (*paired ends*) lecturas, es decir 5.552.200 secuencias que se ensamblaron secuencialmente mediante *Geneious 9.0*, generando 8 contigs plasmídicos y 71 contigs cromosómicos mayores de 1 Kb, con N<sub>50</sub> de 257.850 nucleótidos y una estimación de tamaño del cromosoma de 5.3 Mb.

Se hizo una anotación y predicción de los marcos de lectura usando el servidor RAST y se complementaron los resultados usando los programas web *ResFinder 2.1* y *PlasmidFinder 2.1*.

Categoría de genes en subsistemas (RAST)	Nº de genes
<b>Cofactores, Vitaminas, Grupos Protésicos, Pigmentos</b>	372
<b>Pared celular y cápsula</b>	230
<b>Virulencia y Defensa</b>	149
<b>Metabolismo del potasio</b>	41
<b>Varios</b>	65
<b>Fagos, Profagos, Elementos transponibles, Plásmidos</b>	29
<b>Transporte de Membrana</b>	265
<b>Adquisición y metabolismo del hierro</b>	71
<b>Metabolismo del ARN</b>	254
<b>Nucleósidos y nucleótidos</b>	141
<b>Metabolismo de las proteínas</b>	312
<b>División Celular y Ciclo Celular</b>	43
<b>Motilidad y Quimiotaxis</b>	8
<b>Regulación y señalización celular</b>	177
<b>Metabolismo Secundario</b>	5
<b>Metabolismo del ADN</b>	135
<b>Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides</b>	144
<b>Metabolismo del Nitrógeno</b>	48
<b>Esporulación</b>	5
<b>Respiración</b>	188
<b>Respuesta al estrés</b>	183
<b>Metabolismo de compuestos aromáticos</b>	79
<b>Aminoácidos y Derivados</b>	555
<b>Metabolismo del Azufre</b>	81
<b>Metabolismo del fósforo</b>	74
<b>Hidratos de carbono</b>	922

**Tabla 8:** Número de genes según la categoría.

Se anotaron un total de 5.477 genes de los cuales 5.359 codifican proteínas y 118 corresponden a RNAs (Tabla 8). Se observaron 149 genes relacionados con virulencia y resistencia a antibióticos o antisépticos. Entre ellos se encuentran cinco genes de betalactamasas bla<sub>CTXM-15</sub>, bla<sub>OXA-1</sub>, bla<sub>OXA-48</sub>, bla<sub>SHV-11</sub> y bla<sub>TEM-116</sub>. Cuatro genes resistencia a

aminoglucósidos: *aac(6')-Ib-cr* y *aph(3')-Ia*, *aac(3)-IIa* y *aadA2*. Resistencias a sulfonamidas por *sul1*, a macrolidos por *mph(A)*, a quinolonas por *QnrB1* y a trimetoprim por *dfrA12*.

Además, se observaron mutaciones en los genes cromosómicos *parC* (S80I, E84I) y *gyrA* (S83F y D87A) que confieren resistencia a quinolonas. Puede presentar resistencia a cloranfenicol asociada a *catA1* y *catB3*

El serotipo capsular se determinó mediante análisis de las secuencias del gen *wzy* y del *cluster cps*. En ambos casos se identificó el serotipo K24 (157, 158).

Además se localizaron orígenes de replicación de dos plásmidos del tipo *IncL/M* e *IncFIB*. El plásmido de tipo *IncL/M* es el *pOXA-48* (JN626286) portador del gen de la carbapenemasa bla<sub>OXA-48</sub> y que tiene un tamaño de unas 64Kb. El fragmento del plásmido de tipo *IncFIB* mostraba similitud con el plásmido *pKPN-A-68* (CP009777) y presentaba un tamaño de unas 100Kb.

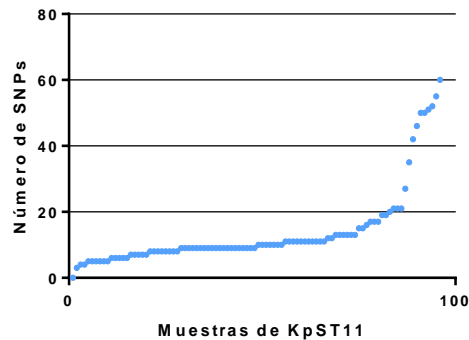
## 1.2. Análisis de polimorfismos (SNPs)

Para identificar las variaciones de secuencias se hizo un análisis SNPs utilizando como referencia el genoma de Kp2. Para ello se generó un *pseudogenoma* del que se excluyeron los plásmidos. Los polimorfismos de cada genoma secuenciado se identificaron con *Geneious 9.0.*, poniendo como criterios una cobertura mínima de al menos el 80% de la cobertura media de la muestra y un 98% mínimo de coincidencia en todas las secuencias.

Con estos criterios, se identificaron 468 SNPs en 96 de las 97 cepas secuenciadas con respecto a la cepa de referencia Kp2, 317 (67.7%) fueron transiciones y 151 (32.3%) transversiones. Los cambios de nucleótidos más frecuentes fueron el cambio de una guanina por una adenina en 110 ocasiones (23.5%) seguido del cambio citosina por timina 103 veces (22%). Se encontraron 69 SNPs (14.7%) en zonas no codificantes, mientras que 399 (85.3%) estaban en regiones codificantes. De éstos, 285 (60.9%) resultaban en un cambio de aminoácido (Anexo 3).

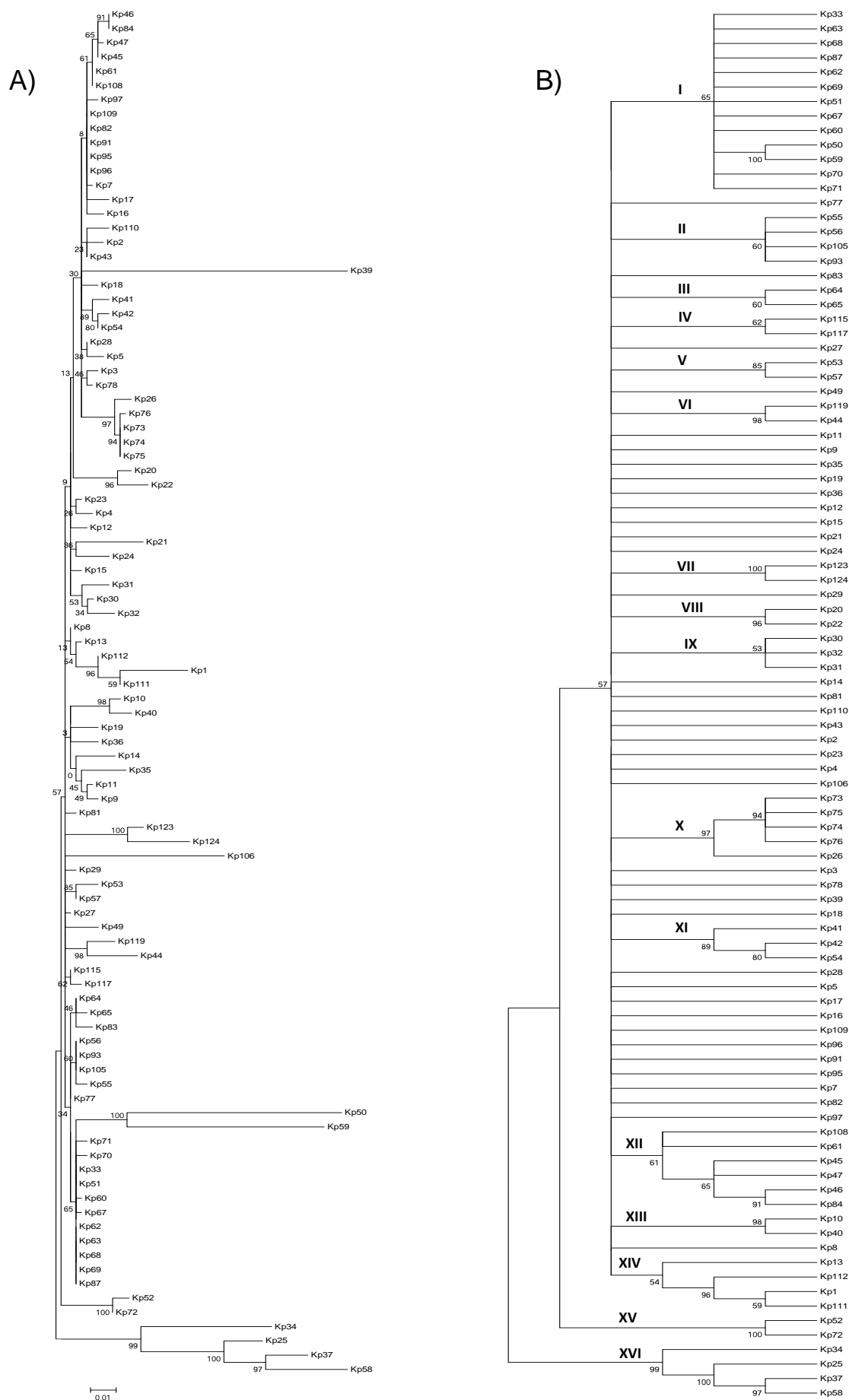
En uno de los aislados (Kp38) se identificaron 3.788 SNPs. Se realizó un ensamblaje y se analizó su secuenciotipo utilizando la herramienta de identificación de MLST disponible en el *Genomic Epidemiology Center* (<http://www.genomicepidemiology.org/>). Aunque el análisis confirmó que se trataba de un ST11, se consideró que debía tener un origen diferente al resto, y se retiró del análisis.

En el resto de los aislados el número de SNPs con respecto a Kp2 oscilaba entre 3 y 60, indicando un origen común reciente. El número medio de SNPs por aislado era 13.8 con una mediana de 9.5. La mayoría de los aislados KpOXA-ST11 tenían entre 0 y 21 SNPs, tan solo 10 aislados que tenían entre 25 y 60 SNPs (Figura 13). De los 468 SNPs, 138 eran filogenéticamente informativos (aparecían en al menos dos aislados), y 330 eran únicos (aparecían en un solo aislado).



**Figura 13:** Gráfica que representa el número de polimorfismos por aislados ordenados de menor a mayor número de SNPs

Para estudiar la similitud entre aislados se realizó un análisis filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura-Nei (154). Se generó un árbol filogenético que permitía agrupar los aislados (Figura 14, A). Para establecer el árbol consenso se realizó un *bootstrap* de 500 repeticiones (Figura 14, B)(159). Las ramas reproducidas en menos del 50% de las réplicas se agrupan de manera independiente. El porcentaje de veces que los taxones aparecían asociados en las réplicas se muestra junto a las ramas. Se otorgó un número arbitrario a cada clado para facilitar la descripción que se realiza a continuación (Figura 14, B).



**Figura 14:** Árbol filogenético de las 96 cepas analizadas. A) Representación topológica de las distancias filogenéticas.

B) Árbol consenso (*bootstrap* con 500 repeticiones)

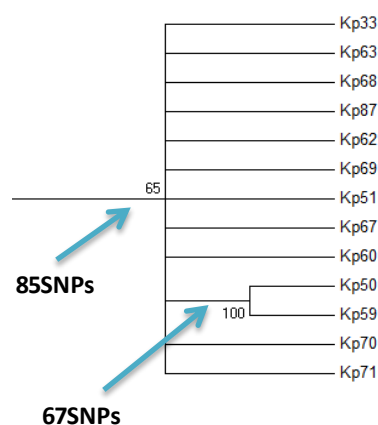


El árbol topológico (Figura 14, A) muestra que la mayoría de los aislados se sitúan cerca de la base, es decir son todos muy cercanos. Existen únicamente siete aislados que se separan, Kp39 aparecía alejado a pesar de que presentaba 13 SNPs, se aisló en 2014 en la unidad G14C. Kp50 y Kp59 aparecían alejados y agrupados, ambos fueron aislados en la unidad G02C en 2013. Por último aparecía una rama del árbol que agrupaba a Kp34, Kp25, Kp37 y Kp58, que tienen más de 20 SNPs con respecto a la referencia. Son aislados de 2014 pero se recogieron en diferentes unidades del hospital, Kp58 en G02C, Kp34 en GCNE y Kp25 y Kp37 en G05C.

En el árbol consenso (Figura 14, B) se destacan los grupos más fuertemente asociados, y se separan aquellos aislados que no tenían suficiente soporte en el análisis de *bootstrap* para ser incluidos en ningún grupo y que en la representación topológica aparecen cerca de la base y muy cercanos al resto. Esto ocurre en 36 aislados en los que el número de SNPs era demasiado bajo y el análisis filogenético no tenía capacidad de discriminación.

A continuación se comentan los grupos o clados más relevantes o con mayor significación en el árbol consenso:

El clado I (Figura 14, B) estaba compuesto por 13 aislados que se agruparon el 65% de las veces y que presentaron entre 9 y 55 SNPs, aunque la mayoría tenía 9 (Figura 15). Este clado, tenía 85 SNPs entre todos los aislados que lo forman, pero excluyendo Kp50 y Kp59, solo presentaban 4 SNPs entre ellos y una media de 9 SNPs con la referencia. Kp50 y Kp59 tuvieron 67 SNPs entre ellos y más de 50 con la referencia Kp2, aunque tuvieron un número amplio de SNPs aparecían juntos en el *bootstrap* el 100% de las veces. Si se observa el árbol topológico tanto Kp50 como Kp59 aparecían en el mismo clado pero formaron otra rama alejada del resto. Todos los aislados de este grupo pertenecían a la planta G02C excepto Kp33 que pertenece a G01I. Todos fueron recogidos en un período de 20 meses, entre marzo de 2013 y septiembre de 2014 (Tabla 9).



**Figura 15:** Relación de SNPs que existen entre los aislados del clado I.

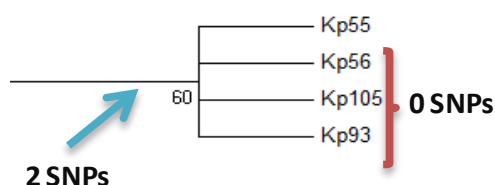
Aislados	SNPs con Kp2	Fecha aislamiento	Unidad de aislamiento
Kp33	9	04/12/2013	G01I
Kp63	9	15/07/2013	G02C
Kp68	9	19/08/2013	G02C
Kp87	9	07/01/2014	G02C
Kp69	9	01/08/2014	G02C
Kp62	9	04/03/2013	G02C
Kp51	9	25/11/2013	G02C
Kp57	9	20/05/2014	G02C
Kp60	10	13/05/2013	G02C
Kp50	55	02/12/2013	G02C
Kp59	52	18/11/2013	G02C
Kp70	11	04/07/2014	G02C
Kp71	11	05/09/2014	G02C

**Tabla 9:** Aislados que se agrupan en el clado I.

El clado II (Figura 14, B) estaba formado por cuatro aislados recogidos con algo más de un año de diferencia entre los dos primeros y los dos últimos. Los cuatro aparecían agrupados el 60% de las veces con la presencia de 2 SNPs, tres de ellos eran idénticos, Kp56, Kp105 y Kp93. Kp55 presenta dos SNPs con respecto al grupo de los tres aislados idénticos. Los aislados de 2013 pertenecían a G02C y los de 2014 a G08C. Tuvieron una media de 9 SNPs con respecto a la referencia Kp2 (Tabla 10 y Figura 16).

Aislados	SNPs con Kp2	Fecha aislamiento	Unidad de aislamiento
Kp55	11	28/01/2013	G02C
Kp56	9	08/02/2013	G02C
Kp105	9	22/04/2014	G08C
Kp93	9	17/02/2014	G08C

**Tabla 10:** Aislados que se agrupan en el clado II.



**Figura 16:** Relación de SNPs que existen entre los aislados del clado II

La rama IX (Figura 14, B) estaba formada por tres aislados que se recogieron en la unidad IV05 durante el año 2012 aparecen juntos en el *bootstrap* el 53% de las veces y que presentó una media de 11 SNPs con respecto a la referencia y 12 SNPs entre ellos (Tabla 11 y Figura 17).

Aislados	SNPs con Kp2	Fecha aislamiento	Unidad de aislamiento
Kp30	10	24/02/2012	IV05
Kp32	12	27/07/2012	IV05
Kp31	11	28/08/2012	IV05

Tabla 11: Aislados que se agrupan en el clado IX.

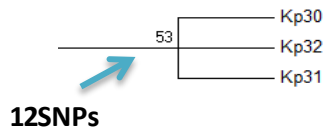


Figura 17: Relación de SNPs que existen entre los aislados del clado IX.

El clado X (Figura 14, B) estuvo formado por 5 aislados, con una media de 11 SNPs con respecto a la referencia Kp2, todos se aislaron en un período de 20 días en septiembre-octubre de 2014 y excepto Kp26, que se recogió en la unidad T04N, pertenecen a G02C. Dentro de este grupo había 3 muestras idénticas entre sí, Kp73, Kp74 y Kp75, y una, Kp76, con un único SNP de diferencia. En el *bootstrap* estos cuatro aislados aparecían juntos el 94% de veces. En el grupo se observaron 5 SNPs entre las muestras si se incluía Kp26, que aparecía junto a ellos. Estos aislados se asociaron el 97% de las veces en el *bootstrap* (Tabla 12 y Figura 18).

Aislados	SNPs con Kp2	Fecha aislamiento	Unidad de aislamiento
Kp73	11	06/10/2014	G02C
Kp75	11	24/09/2014	G02C
Kp74	11	19/09/2014	G02C
Kp76	12	03/10/2014	G02C
Kp26	13	11/12/2014	T04N

Tabla 12: Aislados que se agrupan en el clado X.

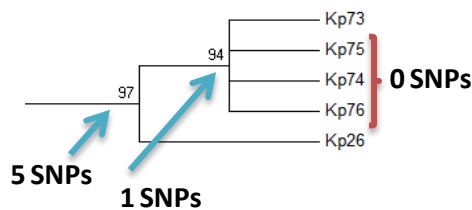


Figura 18: Relación de SNPs que existen entre los aislados del clado X.

En la rama XI (Figura 14, B) se encontraron 3 aislados que tuvieron una media de 8 SNPs con respecto a la referencia. Se recogieron en junio de 2013, con apenas unos días de diferencia, en tres unidades distintas: G08C, G03C y G02C. Kp42 y Kp54 tuvieron un único SNP entre ellas y aparecían juntas el 80% de las veces en el *bootstrap*. Si se incluía en la rama Kp41 se encontraban 6 SNPs entre los aislados. Este clado aparecía junto en el 89% de las réplicas del árbol consenso (Tabla 13 y Figura de 19).

Aislados	SNPs con Kp2	Fecha aislamiento	Unidad de aislamiento
Kp41	9	11/06/2013	G08C
Kp42	9	20/06/2013	G03C/G03R
Kp54	7	10/06/2013	G02C

Tabla 13 Aislados que se agrupan en el clado XI.

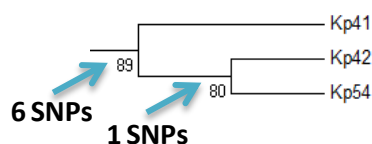


Figura 19: Relación de SNPs que existen entre los aislados del clado XI.

El grupo formado por 6 aislados en la rama XII (Figura 14, B) presentaba una media de 7 SNPs con respecto a la referencia. La rama aparece el 61% de las veces en el *bootstrap*. Todas las muestras se aislaron en un período de nueve meses en 2013 en la unidad G08C excepto Kp61 que fue aislado de la unidad G02C. Kp46 y Kp84 no tuvieron SNPs entre ellas y aparecían juntas el 91% de las veces. Kp45 y Kp47 tuvieron un SNP, pero si se incluía además Kp46 y Kp84 se encontraban 3 SNPs en el grupo. Este grupo de cuatro aparecía junto el 65% de las veces. Si al análisis se añadía Kp108 y Kp61 ese encontraban 4 SNPs (Tabla 14 y Figura 20).

Aislados	SNPs con Kp2	Fecha aislamiento	Unidad de aislamiento
Kp108	6	01/03/2013	G08C
Kp61	6	22/04/2013	G02C
Kp45	7	09/07/2013	G08C
Kp47	8	22/07/2013	G08C
Kp46	9	22/07/2013	G08C
Kp84	9	18/11/2013	G08C

Tabla 14: Aislados que se agrupan en el clado XII.

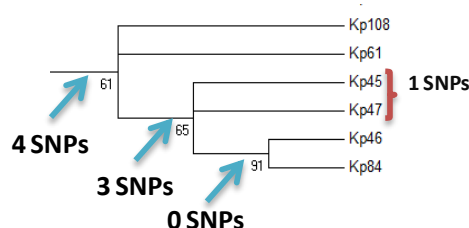


Figura 20: Relación de SNPs que existen entre los aislados del clado XII.

En la rama XIV (Figura 14, B) los aislados tenían una media de 14 SNPs con la referencia y aparecían juntos el 54% de las veces. Estas cepas se aislaron desde 2012 a 2015 en distintos lugares del hospital, G06C, G08C y G03C. Kp1 y Kp111 que aparecían juntas en una rama con un 59% tenían 12 SNPs y más de un año de diferencia entre ellas, si en este grupo se incluían Kp112, aparecían juntos el 96% de las veces, se encontraron 16 SNPs. Y si se analizaba la rama completa se encuentran 18 SNPs dentro del grupo formado por estos cuatro aislados (Tabla 15 y Figura de 21).

Aislados	SNPs con Kp2	Fecha aislamiento	Unidad de aislamiento
<b>Kp13</b>	10	27/11/2012	G06D
<b>Kp112</b>	11	17/02/2015	G08C
<b>Kp1</b>	21	07/02/2014	G03C
<b>Kp111</b>	15	03/08/2015	G08C

Tabla 15: Aislados que se agrupan en el clado XIV.

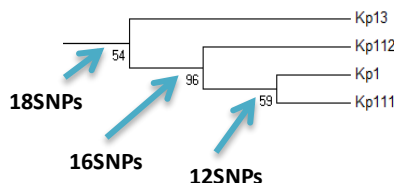


Figura 21: Relación de SNPs que existen entre los aislados del clado XIV

La rama XVI (Figura 14, B) formada por Kp34, Kp25, Kp37 y Kp58 y aparecen juntos el 99% de las veces en el *bootstrap*. Estas muestras aparecen como un *cluster* aparte en el árbol filogenético y son las que más cantidad de SNPs presentan con respecto a la referencia Kp2. Todas ellas fueron aisladas en un período de 8 meses en 2014 en diferentes unidades del hospital, G02C, GCNE, G05C y G05D. Kp37 y Kp58 tienen 22 SNPs entre ellas que se aumentan hasta 36 si en ese grupo se incluía Kp25. El grupo formado por estos cuatro aislados presenta 70 SNPs entre todas las muestras (Tabla 16 y Figura 22).

Aislados	SNPs con Kp2	Fecha aislamiento	Unidad de aislamiento
<b>Kp34</b>	46	08/04/2014	GCNE
<b>Kp25</b>	42	16/09/2014	G05D
<b>Kp37</b>	50	29/08/2014	G05C
<b>Kp58</b>	60	07/11/2014	G02C

Tabla 16: Aislados que se agrupan en el clado XVI.

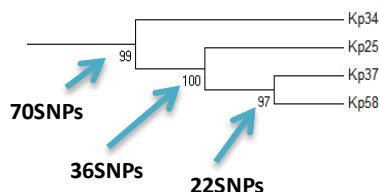


Figura 22: Relación de SNPs que existen entre los aislados del clado XVI.

Se observaron 8 clados compuestos por dos aislados (ramas III, IV, V, VI, VII VIII, XIII y XV) (Figura 14, A). En este caso cabe recalcar que las 5 cepas pertenecientes al H12O aparecen en dos grupos que están entremezclados con los pertenecientes al HULP. Dos de ellas, Kp115 y Kp117 se diferenciaban en 2 SNPs mientras que Kp123 y Kp124 presentaron 14 SNPs. La cepa restante, Kp119, aparecía asociada a una muestra del HULP, Kp44, que se aisló en la planta G08C dos años antes. Estas dos cepas tuvieron 14 SNPs (Tabla 17).

Aislados	SNPs con Kp2	Fecha aislamiento	Unidad de aislamiento	SNPs entre ellas
Kp115	8	13/08/2013	H12O	2
Kp117	10	08/01/2014	H12O	
Kp53	13	12/04/2014	G02C	3
Kp57	9	20/05/2014	G02C	
Kp119	16	05/02/2015	H12O	14
Kp44	21	05/08/2013	G08C	
Kp123	21	30/09/2015	H12O	14
Kp124	27	19/10/2015	H12O	
Kp20	13	15/07/2013	G03C	8
Kp22	19	26/04/2014	GUSS	
Kp10	17	16/05/2015	G02C	6
Kp40	15	06/02/2015	M08C	
Kp52	20	12/04/2014	G02C	3
Kp72	17	29/08/2014	G02C	

**Tabla 17:** Aislados que se agrupan de dos en dos.

## 2. Elementos Móviles y Genes de Resistencia

En un análisis preliminar se observó que en algunos aislados se habían perdido genes de resistencia. Para estudiar en detalle la presencia o ausencia de genes de resistencia, plásmidos y elementos de inserción, así como las variaciones en número de copias se realizó un mapeo con las secuencias de los 96 aislados analizados frente a un set de genes de resistencia, plásmidos y elementos de inserción identificados en Kp1 y Kp2.

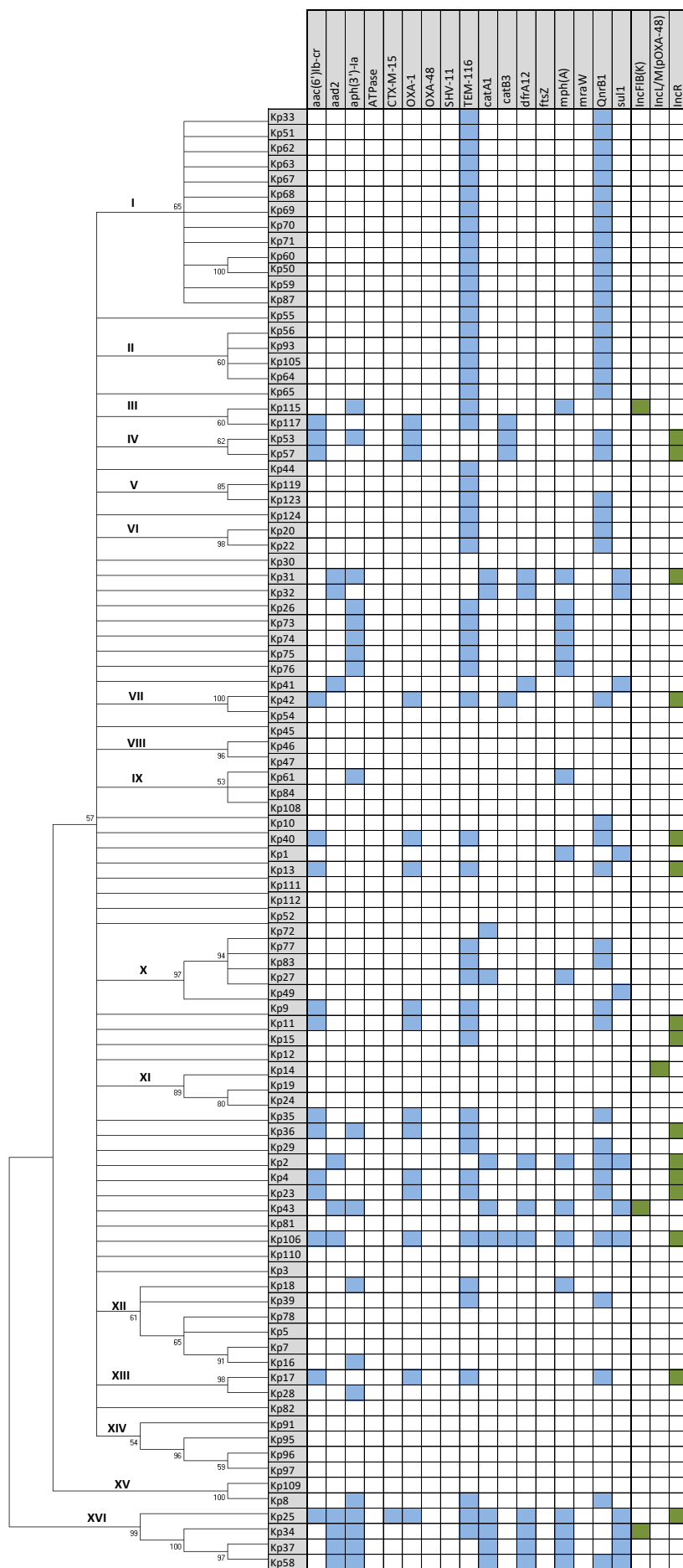
### 2.1. Variabilidad de plásmidos y genes de resistencia.

Se estudió la presencia o ausencia de los distintos plásmidos así como los genes de resistencia (Tabla 18). La mayoría de los genes de resistencia se identifican en más del 80% de las cepas, excepto dos genes, TEM-116 y *QnrB1*, que se encontraron tan solo en el 50% de los aislados. Se detectó un aislado, Kp106, que había perdido SHV-11 a pesar de ser un gen cromosómico. Además Kp25 había perdido CTX-M-15 que está asociado a plásmidos y suele ir flanqueado por un elemento de inserción tipo *ISEcp-1*.

Con respecto a los plásmidos, más del 85% de los aislados presentaron los mismos plásmidos que la referencia Kp2, *IncFIB(K)* e *IncL/M*. Además en el 83% de las cepas existía otro plásmido, de tipo *IncR*. Se trata de un plásmido de pequeño tamaño, aproximadamente 50kb. Kp14 había perdido el plásmido *IncL/M* aunque mantenía el gen de OXA-48.

	Ausencia	Presencia
<i>aac(6')Ib-cr</i>	17	79
<i>aadA2</i>	14	82
<i>aph(3')-Ia</i>	21	75
CTX-M-15	1	95
OXA-1	16	80
OXA-48	0	96
SHV-11	1	95
TEM-116	53	43
<i>catA1</i>	14	82
<i>catB3</i>	12	84
<i>dfrA12</i>	13	83
<i>mph(A)</i>	19	77
<i>QnrB1</i>	44	52
<i>Sul1</i>	15	81
<i>IncFIB(K)</i>	4	82
<i>IncL/M</i>	1	95
<i>IncR</i>	16	80

**Tabla 18:** Número de aislados que presentan o no los distintos genes de resistencia y plásmidos.



**Figura 23:** Representación de la ausencia de genes de resistencia (cuadros en azul) y de ausencia plásmidos (cuadros en verde) en las cepas analizadas ordenadas según el árbol filogenético de SNPs. Genes control: *ftsZ*, *mraW* y *ATPase*.



Si se tiene en cuenta la presencia o no de los distintos tipos de genes de resistencia y de plásmidos en las cepas ordenadas según el árbol filogenético (Figura 23) se observa que las cepas que pertenecen al clado I, junto a otras 13 cepas más habían perdido los genes TEM-116 y *QnrB1*. Existen varios patrones, aislados que se diferencian en pocos SNPs pero que tienen diferencias en genes de resistencia, por ejemplo Kp115 y Kp117 que presentaron 2 SNPs difieren en 5 genes de resistencia y además Kp115 había perdido el plásmido *IncFIB(K)*. Por el contrario, también aparecen aislados que se diferencian por SNPs pero que tienen el mismo patrón de genes de resistencia, por ejemplo Kp119 y Kp44, con 14 SNPs tenían el mismo patrón de genes de resistencia. Aparecen aislados que no se diferencian por SNPs y tienen el mismo patrón de genes de resistencia, por ejemplo Kp74, Kp75 y Kp76. Y también existen aislados dentro de un clado que tienen SNPs y distintos patrones de genes de resistencia, por ejemplo el clado XVI formado por Kp34, Kp25, Kp37 y Kp58 tuvo patrones de genes de resistencia diferentes para cada cepa, este grupo poseía 70 SNPs.

A continuación se estudió la variabilidad en el número de copias de los diferentes genes de resistencia y elementos móviles a partir del número de lecturas obtenidos por cada aislado y normalizando con el número de lecturas obtenidas en genes de copia única (*ATPase*, *mraW* y *ftsZ*).

En el caso de los plásmidos el número de copias variaba en un rango de 0 a 6 copias en *IncFIB(K)* o *IncR* llegando hasta 11 en *IncL/M*. Con respecto a la variabilidad general del CN de los plásmidos, *IncFIB(K)* fue el más estable con una copia por genoma en el 50% de los aislados (Figura 24). Por otro lado el plásmido más variable en CN fue el *IncL/M* con 3-4 copias por genoma de media, y una dispersión bastante amplia de valores, hasta 11 copias en Kp34 (Tabla 19).

	<i>IncFIB(K)</i>	<i>IncL/M</i>	<i>IncR</i>
<b>Mínimo</b>	0	0	0
<b>Máximo</b>	5	11	6
<b>Media</b>	1,24	3,75	2,11
<b>Desv. Estand.</b>	0,69	2,68	1,50

Tabla 19: CN de los plásmidos.

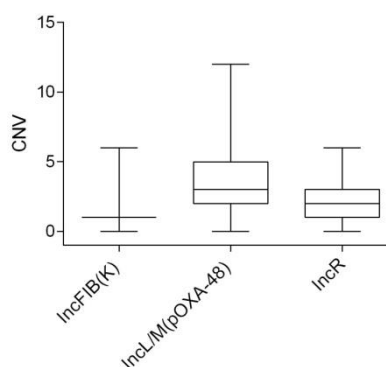


Figura 24: Distribución del número de CN de los plásmidos.

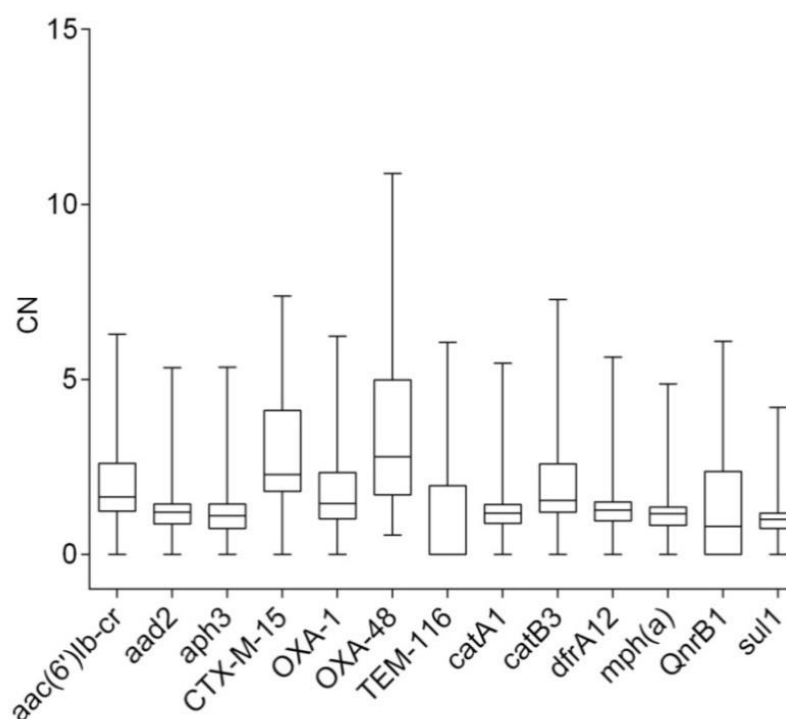
La media del número de copias de genes de resistencia oscilaba entre 1 y 4, con mínimos y máximos entre 0 y 5-7 copias, excepto OXA-48 que llega a las 11 (Tabla 20 y Figura 25); el número de copias de OXA-48 se correlacionó perfectamente con el número de copias del plásmido *IncL/M*, los otros genes sin embargo no se correlacionaban con los otros dos plásmidos, indicando una situación dinámica en la que algunos genes pueden estar en varias copias y en números variables dentro de los plásmidos (Tabla19 y Figura 24).

	aac(6')lb-cr	aadA2	aph(3')-la	CTX-M-15	OXA-1	OXA-48
<b>Mínimo</b>	0	0	0	0	0	1
<b>Máximo</b>	6	5	5	7	6	11
<b>Media</b>	1,93	1,16	1,05	2,84	1,75	3,70
<b>Desv. Estand.</b>	1,41	0,75	0,75	1,52	1,35	2,60

	TEM-116	catA1	catB3	dfrA12	mph(a)	QnrB1	sul1
<b>Mínimo</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>Máximo</b>	6	5	7	6	5	6	4
<b>Media</b>	1,06	1,16	2,15	1,21	1,08	1,17	0,95
<b>Desv. Estand.</b>	1,44	0,79	1,70	0,76	0,82	1,37	0,62

**Tabla 20:** Número de CN de genes de resistencia.



**Figura 25:** Distribución del número de CN de los genes de resistencia.

En el momento de generar el *pseudocromosoma* de Kp2 para el estudio de SNPs se separaron las secuencias que contenían elementos plasmídicos. Al mapear las lecturas cromosómicas, y las lecturas totales de Kp2 contra un fichero conteniendo las secuencias de los ISs, se observó que los elementos de inserción *IS26* e *ISKpn14* se encontraban en las lecturas totales, pero no en las lecturas exclusivamente cromosómicas, indicando que ambos elementos se encontraban únicamente en los plásmidos. Al observar la variación en CN de *ISEcp1* e *ISKpn1*, los IS cromosómicos, se ve que son menos variables que los plasmídicos. *ISKpn1* se encontró en 5 copias, con un rango de 4 a 5, dentro del error experimental o de redondeo (Tabla 21). *ISEcp1* también es un elemento cromosómico su variación fue un poco mayor que *ISKpn1* (Figura 26) con un rango de 1 a 15. Aunque solo un aislado, Kp1, tenía más de 9 copias de este IS.

En el caso de los IS que forman parte de plásmidos la variación en el rango fue mucho mayor, en *IS26* se pudieron ver diferencias de hasta casi 29 copias y en *ISKpn14* de más de 20 copias (Tabla 21). No solo el rango fue mayor si no que la dispersión fue mucho más amplia que en los IS cromosómicos (Figura 26).

	<i>IS26</i>	<i>ISEcp1</i>	<i>ISKpn1</i>	<i>ISKpn14</i>
<b>Mínimo</b>	2	1	4	4
<b>Máximo</b>	31	15	6	23
<b>Media</b>	11,93	4,52	5,01	11,28
<b>Desv. Estand.</b>	6,03	1,90	0,37	4,72

Tabla 21: Número de CN de IS.

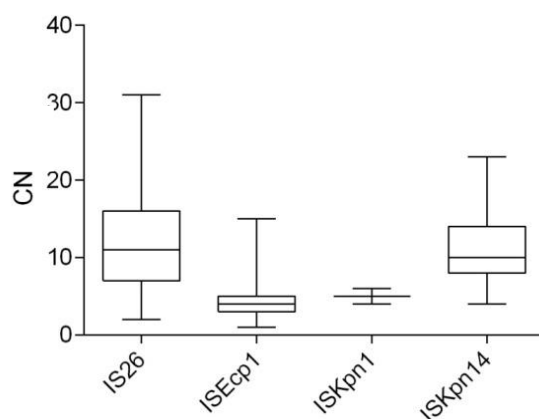


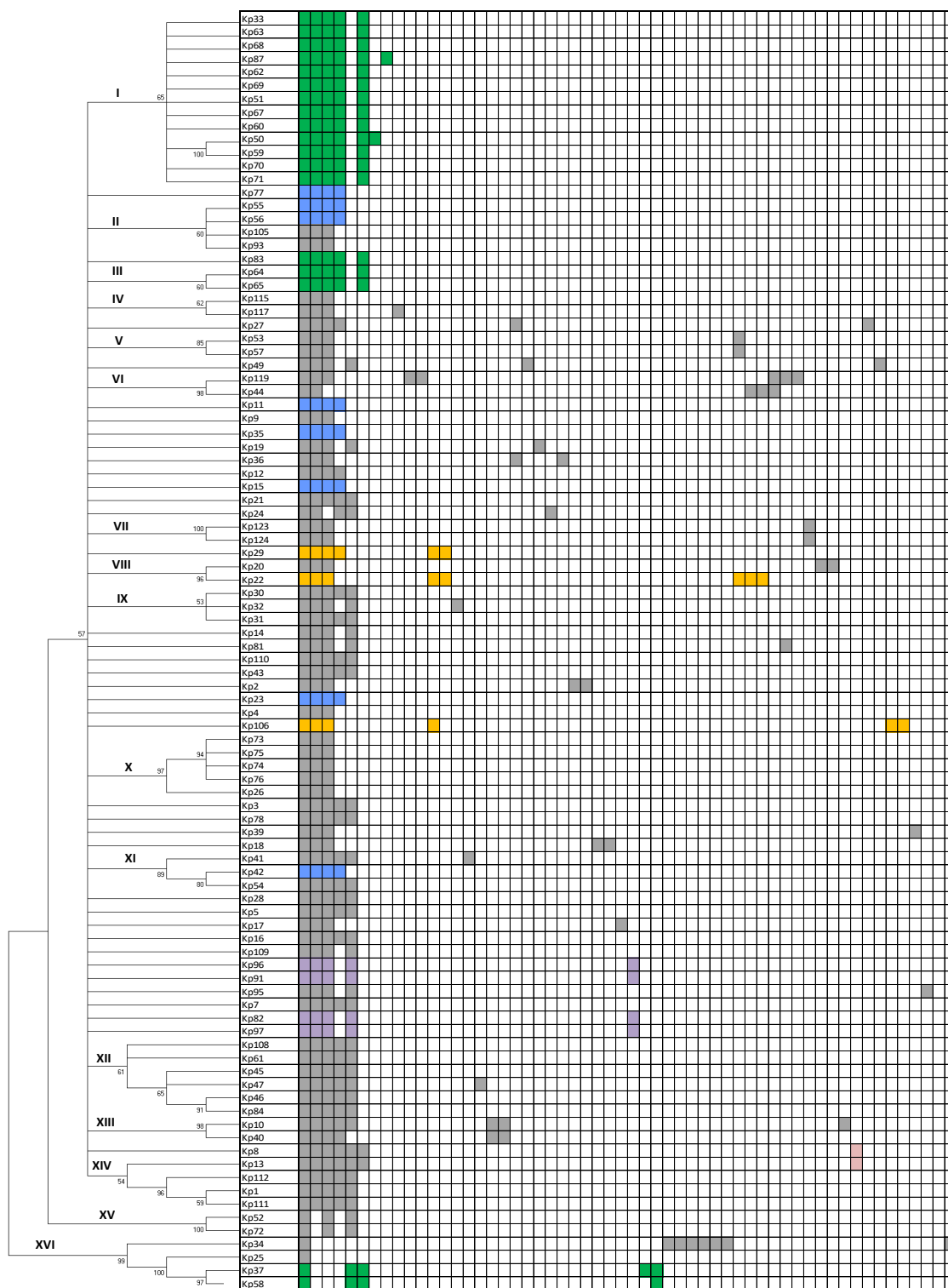
Figura 26: Distribución del número de CN de IS.

## 2.2. Mapeo de los elementos de inserción con respecto a Kp2

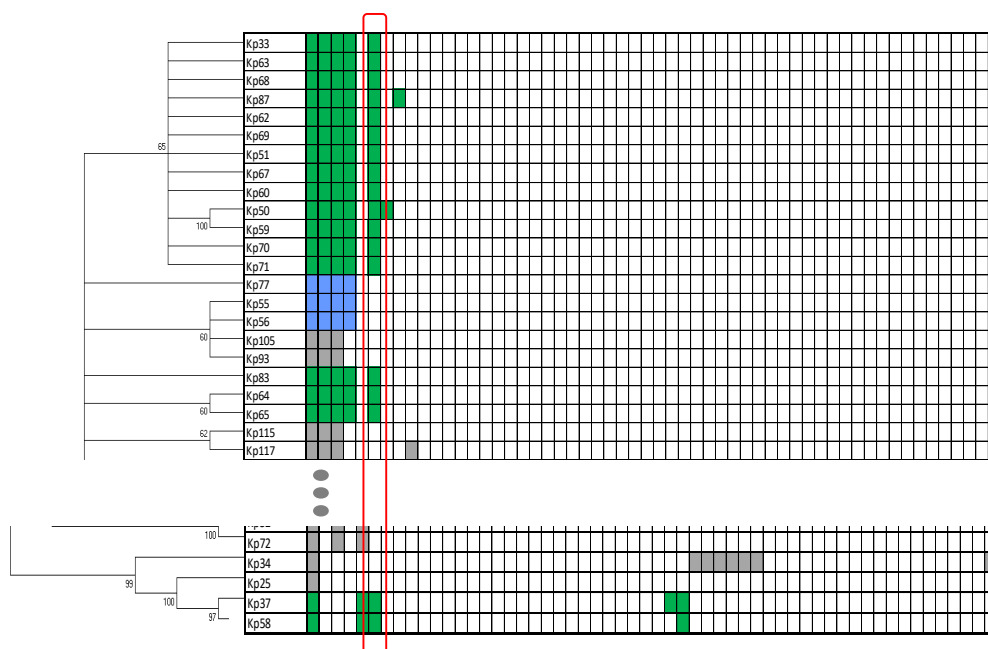
Para establecer relaciones entre aquellas cepas que no se diferenciaban mediante SNPs se realizó un análisis de variaciones en las posiciones de los elementos de inserción. Para ello se extrajeron informáticamente las lecturas que contenían las secuencias de los extremos de los ISs y se localizó el punto de inserción. Aquellas cepas que tuvieran los IS en las mismas posiciones tendrían una relación más estrecha.

El estudio se centró en el análisis de los dos elementos cromosómicos, *ISKpn1* e *ISEcp1*. Para cada cepa se extrajeron las lecturas que contenían los extremos de los ISs y se identificaron las secuencias adyacentes, bien sobre el pseudocromosoma de Kp2, bien sobre *Genbank*. *ISKpn1* mostró muy poca variabilidad (Anexo 4). En cuanto a *ISEcp1*, se identificaron cinco sitios de inserción en Kp2, dos de ellos únicos de este aislado. En Kp1 se identificaron también cinco sitios, tres de ellos comunes a Kp2. Los cinco sitios de inserción de Kp1 fueron los más frecuentes. Además se identificaron hasta 50 sitios de inserción adicionales, la mayoría de ellos únicos, aunque algunos eran compartidos por dos o más aislados (Figura 27).

Un grupo de aislados presentó una inserción de *ISEcp1* interrumpiendo el gen *mgrB* lo que produciría resistencia a colistina. La primera vez que se observó esta inserción fue en Marzo de 2013 en G02C. Además se observa esta inserción fuera del clado I, también se en Kp83, Kp64 y Kp65 y en dos cepas más, Kp37 y Kp58, que forman parte del clado XVI (Figura 27). Con lo cual se podrían relacionar estas cepas aunque tengan más de 10 SNPs con el clado I (Figura 28). Las únicas cepas que no pertenecían a G02C fueron Kp83 de G08C, Kp33 de G01I y Kp37 de G05C.

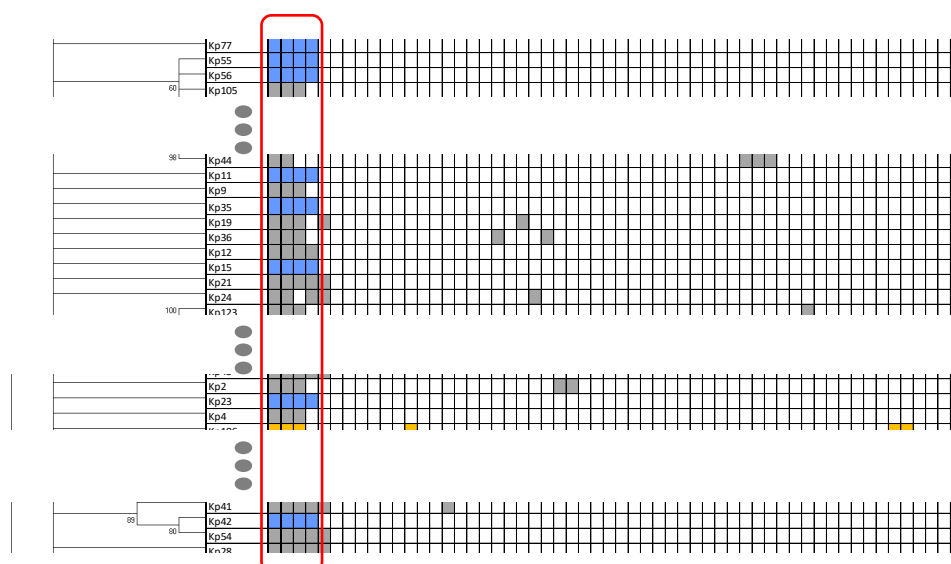


**Figura 27:** Representación de los sitios de inserción del *ISEcp1* en las cepas, las cepas que comparten el mismo color de celda tienen uno o varios sitios de inserción que permiten establecer relaciones entre ellas.



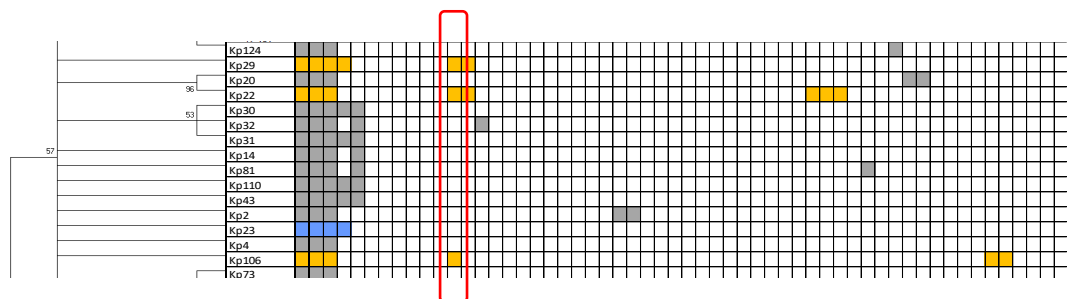
**Figura 28:** Representación del sitio de inserción de *ISEcp1* en las cepas relacionadas, el sitio que permite distinguir este grupo aparece resaltado mediante un cuadro rojo.

Hay otro grupo formado por 8 cepas que poseían un patrón de 4 sitios de inserción que solo compartían estas cepas (Figura 29) Kp77, Kp55, Kp56, Kp11, Kp35, Kp15 y Kp23, y Kp42. Estas cepas están aisladas desde 2012 a 2014 y por distintas zonas del hospital, G02C, G08C, G14C, CBGE, G05D, G11C y G03C. Y aparecen en distintos clados o sin ser agrupadas y separadas en el árbol topológico.



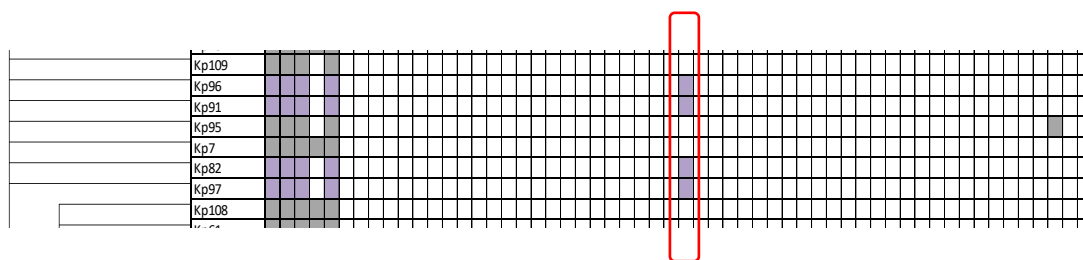
**Figura 29:** Representación del sitio de inserción de *ISEcp1* en las cepas relacionadas, los sitios que permiten distinguir este grupo aparecen resaltados mediante un cuadro rojo.

El siguiente grupo establecido por sitios de inserción estaba formado por tres cepas, Kp29, Kp22 y Kp106, estas tres cepas compartían un sitio de inserción único. Kp29 es la única que fue aislada en 2012, las otras dos pertenecían a aislados de 2014 y las tres fueron recogidas en sitios diferentes (Figura 30).



**Figura 30:** Representación del sitio de inserción de *ISEcp1* en las cepas relacionadas, el sitio que permite distinguir este grupo aparece resaltado mediante un cuadro rojo.

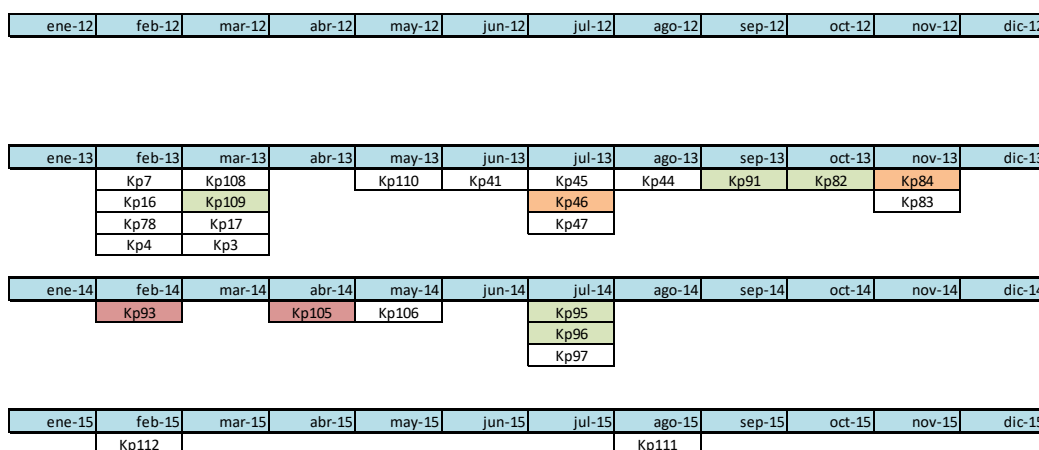
El último grupo que pudo establecerse compartía un sitio de inserción común a todas ellas. Además este grupo fue aislado entre el 2013 y 2014 en la unidad G08C (Figura 31).



**Figura 31:** Representación del sitio de inserción de *ISEcp1* en las cepas relacionadas, el sitio que permite distinguir este grupo aparece resaltado mediante un cuadro rojo.

### 3.1. Análisis de SNPs y Elementos de inserción en la Unidad G08C

De la unidad G08C en la que se encuentra el servicio de Nefrología se recogieron 24 muestras. En el año 2013 se aislaron un total de 29 muestras KpOXA-ST11 en G08C y se secuenciaron 18 de ellas, en el periodo de 2014 se aislaron un total de 9 KpOXA-ST11 de los que se secuenciaron 6 además se han incluido dos aislados de 2015 (Figura 32).



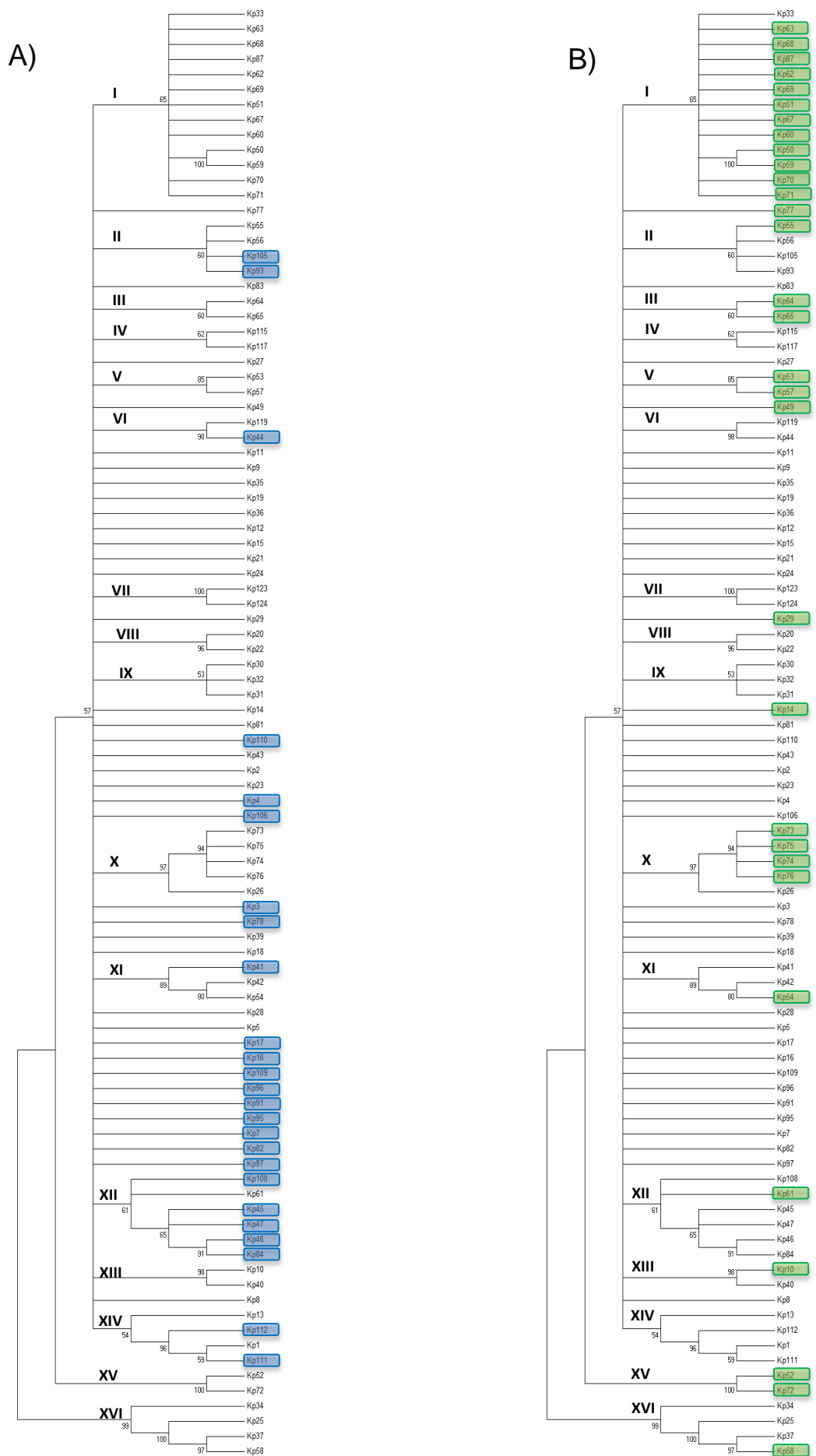
**Figura 32:** Esquema que representa los aislados recogidos en la planta G08C a lo largo del tiempo. Se representan con el mismo color los que son idénticos entre sí.

Aparecen dos muestras localizadas en el clado II (Figura 34, A), Kp105 y Kp93, estas muestras se aislaron con dos meses de diferencia y no existían SNPs entre ellas (Figura 32). Existe además un grupo de aislados que perteneciendo a esta planta no se resuelve en el árbol, estas muestras, Kp17, Kp16, Kp109, Kp95, Kp96, Kp7, Kp82, Kp97, Kp108 y Kp91, se diferencian en 11 SNPs entre ellas y se aislaron en un periodo de un año y cinco meses (Figura 32). Dentro de este grupo existían 5 aislados, Kp109, Kp91, Kp82, Kp95 y Kp96, que no poseen SNPs entre ellos y que se aislaron en un periodo de un año y cuatro meses.

Si se observa en la tabla de elementos de inserción (Figura 31) el grupo formado por Kp96, Kp91, Kp82 y Kp97 puede agruparse por la presencia de un elemento de inserción único (Figura 33). Kp97 se diferencia de los otros tres aislados por 2SNPs que además son únicos en este aislado.



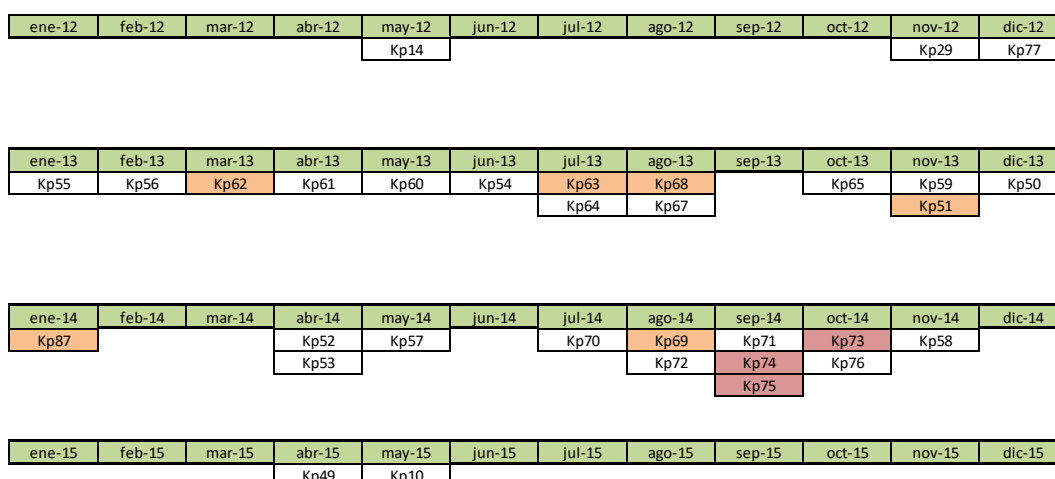




**Figura 34:** a) Árbol consenso de todas las muestras en el que aparece resaltado en azul aquellas muestras que fueron aisladas en la planta G08C. b) Árbol consenso de todas las muestras en el que aparece resaltado en verde aquellas muestras que fueron aisladas en la planta G02C

## 3.2. Análisis de SNPs y Elementos de inserción en la Unidad G02C

De la unidad G02C en la que se encuentra el servicio de Cirugía vascular se recogieron 32 muestras. En el año 2012 se aislaron un total de 5 muestras de KpOXA-ST11 y se secuenciaron 2 de ellas. En el año 2013 fueron recogidas 22 KpOXA-ST11 y se secuenciaron 14 y en 2014 de un total de 17 se secuenciaron 14. Además se han incluido dos muestras de 2015 (Figura 35).



**Figura 35:** Esquema que representa los aislados recogidos en la planta G02C a lo largo del tiempo. Se representan con el mismo color los que no tienen SNPs

Los aislados de esta planta se distribuyen en el árbol (Figura 34, B), había un grupo de 12 aislados, Kp63, Kp68, Kp87, Kp62, Kp69, Kp51, Kp67, Kp60, Kp50, Kp59, Kp70 y Kp71, pertenecientes al clado I del árbol filogenético y que habían sido recogidos en un periodo de un año y medio que aparece relacionado. Dentro de este grupo de 12 aislados se encontraron 6 que no tenían SNPs entre ellos (Figura 35). El grupo Kp64 y Kp65, que aparece formando la rama III, se recogieron con un periodo de diferencia de 3 meses y presentaban 2 SNPs entre ellos.

En el clado V se localizaron Kp63 y Kp67 que fueron aislados con un mes de diferencia y tenían un SNP. El clado X estaba formado por 5 KpOXA-ST11s, Kp73, Kp74, Kp75 y Kp76, que se aislaron en un periodo de dos meses. Kp76 fue el único que difiere del resto con un único SNP. Y por último se encontró el clado XV formado por Kp52 y Kp72 que se aislaron con una diferencia de 4 meses y que tienen 3 SNPs.

En esta unidad existe un grupo predominante formado por aislados que se agrupan en la rama I del árbol y que aparecen a lo largo de un periodo de año y medio (Figura 35). Además aparecen pequeños grupos de aislados muy relacionadas en periodos cortos de tiempo como por ejemplo las muestras formadas por la rama X del árbol (Kp73, Kp74, Kp75 y Kp76).

De las 18 cepas que tienen un IS interrumpiendo el gen *mgrB* hay 15 presentes en G02C (Figura 36). Toda la rama I del árbol (Figura 34, B) y otros dos aislados, Kp58 (rama XVI) y Kp59 y Kp50 (rama I) que tienen más de 20 SNPs con las otras pueden relacionarse por IS.

ene-12	feb-12	mar-12	abr-12	may-12	jun-12	jul-12	ago-12	sep-12	oct-12	nov-12	dic-12
				Kp14						Kp29	Kp77

ene-13	feb-13	mar-13	abr-13	may-13	jun-13	jul-13	ago-13	sep-13	oct-13	nov-13	dic-13
Kp55	Kp56	Kp62	Kp61	Kp60	Kp54	Kp63	Kp68		Kp65	Kp59	Kp50
						Kp64	Kp67			Kp51	

ene-14	feb-14	mar-14	abr-14	may-14	jun-14	jul-14	ago-14	sep-14	oct-14	nov-14	dic-14
Kp87			Kp52	Kp57		Kp70	Kp69	Kp71	Kp73	Kp58	
			Kp53				Kp72	Kp74	Kp76		
								Kp75			

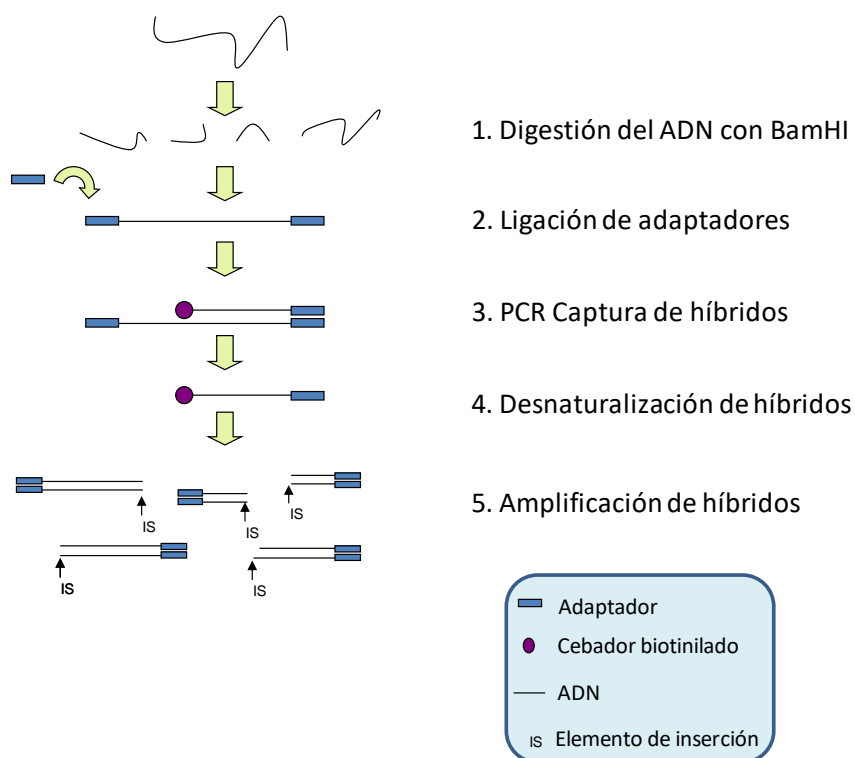
ene-15	feb-15	mar-15	abr-15	may-15	jun-15	jul-15	ago-15	sep-15	oct-15	nov-15	dic-15
			Kp49	Kp10							

**Figura 36:** Esquema relaciona aislados recogidos en la planta G02C a lo largo del tiempo por posición de los IS.

## 4. Detección de IS por captura de secuencias

### 4.1. Desarrollo del protocolo de captura.

El protocolo de captura de híbridos es una forma de enriquecimiento de secuencias. El objetivo era determinar si existe variabilidad en los sitios de inserción de los ISs en una serie de aislados estrechamente relacionados, y si esa variabilidad podría resultar útil para trazar linajes o mejorar la resolución de los linajes establecidos mediante SNPs. En este caso no sería necesario secuenciar el genoma completo de las bacterias para extraer informáticamente la información de los elementos de inserción, en su lugar se realiza una secuenciación dirigida a las regiones de interés. Para enriquecer la secuenciación en estas zonas se desarrolló un protocolo en el que se realizó una digestión con *Bam*HI para generar extremos cohesivos a unos adaptadores que se unían a esta región. A continuación se diseñó una PCR de las zonas colindantes a los IS. Es necesario el uso de cebadores biotinilados que sirvieron como soporte junto a partículas magnéticas con estreptavidina para poder purificar, y por lo tanto “capturar” estas regiones próximas a los IS. Tras una purificación de los amplicones, para eliminar el ADN genómico se realizó la segunda PCR que permite amplificar las secuencias capturadas (Figura 37).



**Figura 37:** Flujo de trabajo diseñado para la captura de híbridos. La línea negra representa el ADN, el cuadro azul los adaptadores y la bola morada el cebador biotinilado.

## 4.2. Muestras seleccionadas para captura de secuencias.

En la captura de secuencias de elementos móviles, se seleccionaron 11 aislados de KpOXA-ST11 recogidos en el Hospital Universitario La Paz. Estos aislados comprendían desde Febrero de 2012 a Febrero de 2014, se escogieron muestras que pertenecieran a los distintos servicios del hospital y que se hubieran aislado de diferentes tipos de muestras (Tabla 22).

Nombre	Fecha	Origen	Tipo muestra
Kp1	07/02/2014	G03C	Absceso abdominal
Kp2	07/02/2014	GUSS	Hemocultivo
Kp3	20/03/2013	GUSS/G08C	Úlcera cutánea
Kp4	15/02/2013	G08C	Orina
Kp5	01/02/2013	G13C	Úlcera cutánea
Kp7	06/02/2013	G08C	Orina
Kp8	03/04/2013	G01I	Aspirado bronquial
Kp9	01/03/2013	GUSS/G14C	Hemocultivo
Kp11	01/03/2013	G14C	Hemocultivo
Kp12	13/04/2012	CBQ2	Espuito
Kp13	27/11/2012	G06D	Herida quirúrgica

Tabla 22: Datos relacionados con los aislados usados en la captura de híbridos.

## 4.3. Análisis de las muestras

Después de realizar la extracción de ADN se sometió al protocolo de captura de híbridos. En el gel de agarosa (Figura 37) se observa el patrón correspondiente a cada aislado, cada banda se correspondería con el extremo de un IS que ha sido amplificado. En el gel se observa amplificación preferencial de algunas secuencias que presentan bandas más intensas.

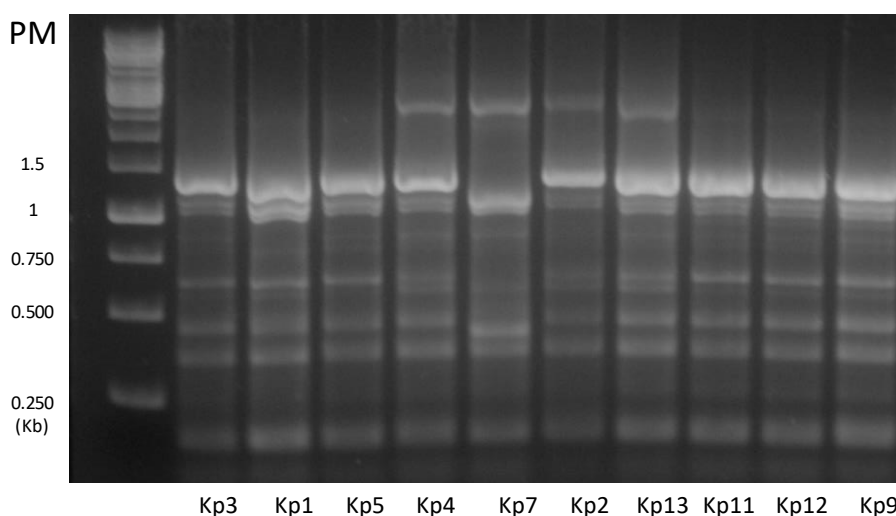


Figura 37: Verificación de la amplificación de IS con oligonucleótidos dirigidos a los distintos IS y los adaptadores.

PM: Marcador de peso molecular (kb).

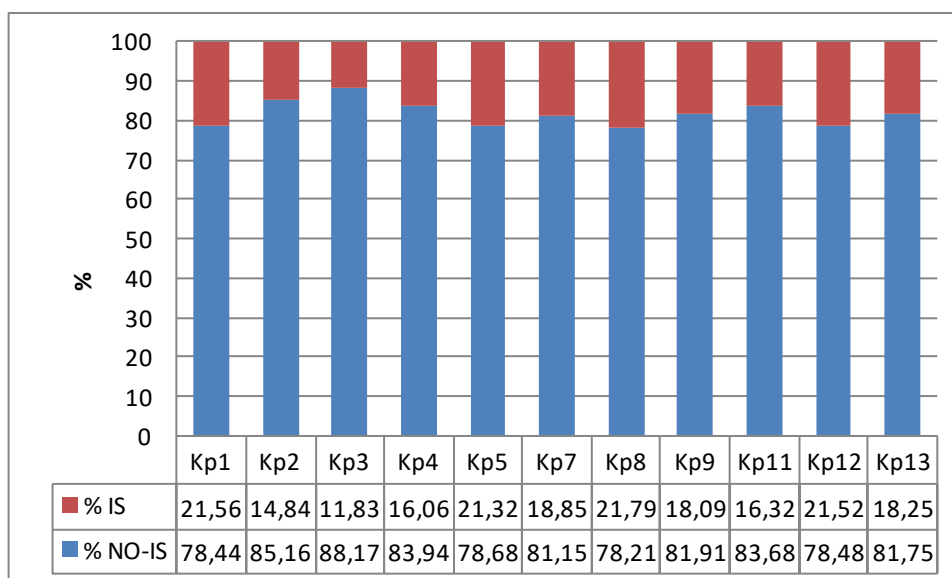
Las once librerías se mezclaron y se realizó una carrera de secuenciación masiva con el sistema GS Junior 454 que produjo un total de 158.222 secuencias de buena calidad y que además presentaban los RL asignados a cada aislado. El número medio de lecturas por aislado es de 13.185, con una desviación típica de 2.804 secuencias. La muestra con más lecturas es Kp4 con 17.866 y la muestra en la que se obtuvo un menor rendimiento de secuencias fue Kp9 con 9.076 (Tabla 23).

	TOTAL	IS26-F	IS26-R	ISEcp-F	ISEcp-R	ISKpn1-F	ISKpn1-R	ISKpn14-F	ISKpn14-R	NO-IS
<b>Kp1</b>	11771	940	935	130	42	96	9	112	274	9233
<b>Kp2</b>	11949	1292	205	33	15	43	7	103	75	10176
<b>Kp3</b>	11003	631	129	94	10	210	26	80	122	9701
<b>Kp4</b>	17866	1899	152	53	5	355	36	317	53	14996
<b>Kp5</b>	14778	1368	1009	153	12	133	19	156	301	11627
<b>Kp7</b>	9841	947	487	167	12	80	10	111	41	7986
<b>Kp8</b>	17089	1815	482	40	14	420	28	569	355	13366
<b>Kp9</b>	9076	1095	187	19	5	44	9	139	144	7434
<b>Kp11</b>	12813	1261	303	31	9	69	57	152	209	10722
<b>Kp12</b>	14042	1041	1181	119	12	94	10	145	420	11020
<b>Kp13</b>	11966	1256	373	50	8	51	12	104	330	9782

**Tabla 23:** Número de secuencias por aislado, y por IS. Se considera NO-IS aquella secuencia que no contiene ningún primer de IS.

Para realizar el análisis de los elementos de inserción se separaron las secuencias por cepa y por IS con el programa bioinformático BioEdit (*Ibis Bioscience*) descartando aquellas secuencias que, aun presentando un RL, no incluían el cebador de alguno de los cuatro IS.

Para poder comparar el enriquecimiento de secuencias con la secuenciación de genoma completo se extrajeron informáticamente las secuencias que contenían alguno de los IS de la cepa de referencia Kp2 secuenciada con la tecnología GS Junior 454 e Illumina. Mediante GS Junior 454 se obtuvieron un total de 195.891 secuencias, de las cuales únicamente 1.149 pertenecían a alguno de los IS lo que representa un 0.58% del total de las secuencias. La tecnología de Illumina resultó en 5.552.200 secuencias de las cuales se corresponden con alguno de los IS 27.943 secuencias, lo que se traduce en un 0.55% del total de las secuencias. En el mejor de los casos, con la captura de híbridos, para Kp8 se llega a obtener un 21.79% de secuencias que pertenecen a un IS (Figura 38), esto se traduce en un enriquecimiento de casi 40 veces.



**Figura 38:** % de secuencias con o sin IS por aislado.

El número de secuencias que incluía algún cebador de IS fue bastante reducido. El caso con mejor rendimiento fue Kp9, para el IS26-F en el que se obtuvieron 1.095 lecturas lo que representó un 12% del total de las secuencias. Por otro lado el peor rendimiento se encontró para Kp4 en ISKpn1-R en el que se capturó 0.03% (Tabla 25). Comparando estos valores con los porcentajes de secuencias que se obtuvieron informáticamente de la secuenciación del genoma completo con GS Junior 454 y/o Illumina de Kp2 se observa un enriquecimiento medio de todos los IS de 33 veces. Enriqueciendo con captura de secuencias se obtuvo una media de un 4.31% de secuencias por cada uno de los cuatro IS mientras que al secuenciar el genoma completo se obtuvo una media de 0.12% de secuencias por IS tanto como con GS Junior 454 como con Illumina.

	IS26-F	IS26-R	ISEcp-F	ISEcp-R	ISKpn1-F	ISKpn1-R	ISKpn14-F	ISKpn14-R	NO-IS
<b>Kp1</b>	7,99	7,94	1,10	0,36	0,82	0,08	0,95	2,33	78,44
<b>Kp2</b>	10,81	1,72	0,28	0,13	0,36	0,06	0,86	0,63	85,16
<b>Kp3</b>	5,73	1,17	0,85	0,09	1,91	0,24	0,73	1,11	88,17
<b>Kp4</b>	10,63	0,85	0,30	0,03	1,99	0,20	1,77	0,30	83,94
<b>Kp5</b>	9,26	6,83	1,04	0,08	0,90	0,13	1,06	2,04	78,68
<b>Kp7</b>	9,62	4,95	1,70	0,12	0,81	0,10	1,13	0,42	81,15
<b>Kp8</b>	10,62	2,82	0,23	0,08	2,46	0,16	3,33	2,08	78,21
<b>Kp9</b>	12,06	2,06	0,21	0,06	0,48	0,10	1,53	1,59	81,91
<b>Kp11</b>	9,84	2,36	0,24	0,07	0,54	0,44	1,19	1,63	83,68
<b>Kp12</b>	7,41	8,41	0,85	0,09	0,67	0,07	1,03	2,99	78,48
<b>Kp13</b>	10,50	3,12	0,42	0,07	0,43	0,10	0,87	2,76	81,75

**Tabla 25:** Secuencias en % por aislado, y por IS. Se considera NO-IS aquella secuencia que no contiene ningún primer de IS.

Existe una clara diferencia en el número de secuencias y porcentaje del total con respecto a los diferentes IS. La distribución del porcentaje no se repite a lo largo de los aislados, lo que



sugiere a una amplificación preferencial de unos IS frente a otros. Todos los aislados presentaron un mayor número de secuencias en la región 5' del IS26 (Figura 39). En general para todos los IS aparecen muestras con un número de secuencias capturadas muy dispar. Si se observa la proporción con respecto a la cantidad total de IS capturados esa variación es menor pero siguen existiendo muestras en IS concretos que difieren ampliamente de la captura media del resto (Figura 39).

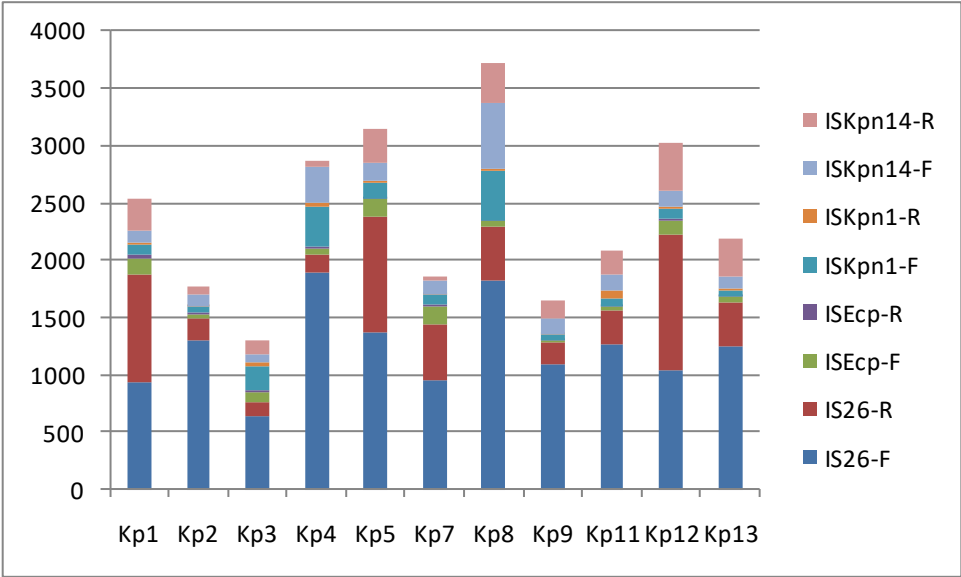


Figura 39: Número de Secuencias por aislado, y por IS.

A continuación se compararon las secuencias de los sitios de inserción obtenidos por la extracción informática de ISs de la secuenciación de genoma completo de Illumina y mediante la captura de híbridos realizada con Junior 454.

	Sitio 1		Sitio 2		Sitio 3		Sitio 4		Sitio 5		Sitio 6		Sitio 7		Sitio 8	
	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
Kp1																
Kp2																
Kp3																
Kp4																
Kp5																
Kp7																
Kp8																
Kp9																
Kp11																
Kp12																
Kp13																

Tabla 26: Comparación de los sitios de inserción obtenidos por extracción informática de secuenciación de genoma completo (I: Illumina, cuadros naranja) y mediante captura de híbridos (R: Roche, cuadros azul). Los cuadros rojos corresponden a secuencias detectadas en genomas completos y no en captura de híbridos.

El método de captura de híbridos fue capaz de detectar el 83.7% de los sitios de inserción. Para el sitio 1 se capturó secuencias el 81.81% de las veces, para el sitio 2 el 6.3.6%, para el sitio 3, 4 y 6 se detectó el 100%, para el sitio 5 el 80% y tanto el sitio 7 como el sitio 8 no fueron detectados (Tabla 26).

# Discusión



Desde comienzos de los años 2000 KpOXA ha adquirido importancia como especie causante de brotes hospitalarios. Su dispersión a escala mundial hace que sea un patógeno objeto de numerosos estudios epidemiológicos. Los brotes causados por KpOXA suelen estar asociados a unos pocos grupos clonales, entre los que cabe destacar el complejo CC258 que incluye el secuenciotipo ST11. Desde que en 2010 se detectó por primera vez KpOXA en el HULP se ha diseminado por todo el complejo hospitalario. El brote es de tipo oligoclonal, se han detectado más de 10 clones (secuenciotipos) diferentes, aunque el ST11 se ha convertido en el clon mayoritario desbancando al clon original ST405. Previamente se habían secuenciado 10 aislados de ST405, se identificaron una serie de SNPs, y se analizaron en 44 aislados más mediante PCR alelo-específica. Este análisis, de resolución limitada, demostraba cierta diversidad genética dentro de ST405. Los aislados estudiados pertenecían a dos linajes diferentes que evolucionaban y se diseminaban por el hospital de manera independiente, además se observaba que dentro de cada unidad aparecían aislados de diferentes genotipos, indicando que lo que aparentemente eran brotes clonales dentro de las unidades, eran entradas sucesivas e independientes (López-Camacho et al., en revisión). En esta Tesis Doctoral se secuencian y comparan los genomas completos de 97 aislados de KpOXA pertenecientes al secuenciotipo ST11 del HULP. Se hace un estudio de la diversidad poblacional de un clon concreto de ST11 en el periodo de abril de 2012 a mayo de 2015 mediante el análisis de SNPs y elementos móviles. Además se realiza un análisis de la dinámica poblacional de KpOXA-ST11 en dos unidades concretas: Nefrología y Cirugía Cardiovascular del HULP. Con el objetivo de aumentar la resolución del análisis genómico, y para mejorar la capacidad de discriminar entre aislados muy cercanos, se desarrolló un protocolo de captura de secuencias diseñado para enriquecer la secuenciación masiva en elementos móviles y secuencias adyacentes.

# 1. Diversidad de la población de KpOXA-ST11

Se han analizado 97 genomas de KpOXA-ST11 mediante la tecnología de Illumina, además una de ellas, Kp2, se secuenció también mediante el sistema GS Junior 454 (ROCHE) para ser usada como referencia en el análisis. Los aislados recogidos eran de origen infeccioso o de colonización. Dado que el número de aislados era demasiado alto para incluirlos todos, se hizo una selección arbitraria de 92 aislados abarcando todo el período de estudio, la mayor parte del centro hospitalario, y de gran diversidad de tipos de muestra. Se seleccionó una fracción aleatoria de todos los aislados de dos unidades concretas, una médica (G08C, Servicio de Nefrología) y otra quirúrgica (G02C, Servicio de Cirugía Vascular). Además se incluyeron 5 aislados de KpOXA-ST11 procedentes del Hospital Universitario 12 de Octubre.

En 96 de 97 aislados el número de SNPs cromosómicos con respecto a la cepa de referencia (Kp2) oscilaba entre 3 y 60. De esas 96, la mayoría presentan alrededor de 10 SNPs, tan solo 10 aislados están por encima de 20 SNPs. Hubo una muestra, Kp38, que presentaba casi 4000 SNPs con respecto a Kp2, por lo que se excluyó del estudio considerando que tenía un origen diferente al resto a pesar de ser ST11, y que había adquirido el plásmido portador de *bla<sub>OXA-48</sub>* independientemente. Esto se ha observado en diversos estudios, como el realizado en el hospital de QuZhou, en China (160). En este estudio se secuenciaron los genomas completos y se analizaron los SNPs de 12 *K. pneumoniae* ST11 productores de KPC aislados en un periodo de un año. Estos aislados tenían patrones de PFGE similares pero el análisis de SNPs los agrupó en tres clados. El número de SNPs entre los diferentes clados excedía los 2000, al igual que ocurre con Kp38. Sin embargo la diversidad dentro de cada clado era inferior a 150 SNPs, indicando que los tres clados correspondían a eventos de transmisión independientes.

El límite para diferenciar eventos de transmisión clonal no está bien definido. La mayoría de los estudios consideran que dentro de un clon se acumulan entre 3 a 10 SNPs por año. Por ejemplo, en un hospital de larga estancia de Virginia, de Estados Unidos, se realizó un estudio en el que se seleccionaron 11 pacientes de los que se disponía de dos aislados del mismo ST obtenidas en diferentes momentos (rango de 0 a 274 días, mediana 18 días) con una media de 1 SNP (rango de 0 a 10 SNPs) se calculó una tasa de sustitución de  $1.9 \times 10^{-6}$  sustituciones/sitio/año, que daría lugar a 10.1 SNPs por genoma y año (161). Esta cifra se aproxima a la obtenida en otro estudio en el Hospital de Patan en Nepal, en el que analizaron 31 aislados de ST15, 25 de ellos estrechamente relacionados. Se identificó un total de 66 SNPs

en su genoma *core*. Realizando un análisis filogenético de máxima verosimilitud basada en estos SNPs fueron capaces de establecer relaciones de transmisión dentro de distintos servicios. Se estimó una media de  $2.7 \times 10^{-6}$  sustituciones por sitio y por año (162).

En el Hospital pediátrico de Bremen, en Alemania, se analizaron 44 aislados de ST514 recogidos durante 3 años que presentaban 56 SNPs por lo que estaban estrechamente relacionados. Se estimó una tasa de  $5.5 \times 10^{-7}$  sustituciones por año y sitio lo que se traduce en una tasa de 3 mutaciones por genoma y año. En aislados obtenidos del mismo paciente con una media de 65 días de diferencia se encontraban de 1 a 2 SNPs, lo cual es consistente con la tasa de evolución calculada (163). En otro estudio, en el que se analizaron filogenéticamente clados formados por un único ST en la población de *K. pneumoniae* multirresistente de Reino Unido e Irlanda se estimó que la tasa de variación era de 3.8 SNPs por genoma y año ( $6.34 \times 10^{-7}$  sitio/año)(164).

En un estudio realizado por el Centro Nacional de Microbiología se analizó un grupo de aislados de ST11 pertenecientes a un brote y otros detectados como casos esporádicos en el periodo de un año. Se observó un promedio de 7 SNPs en las cepas formadoras del brote y un promedio de 20 SNPs con respecto al genoma de *K. pneumoniae* NTUH-K2044 en los ST11 asociados a casos esporádicos(165).

En el HULP se han producido como mínimo dos eventos independientes de dispersión de KpOXA-ST11, el que corresponde a Kp38 y por otro lado el resto de aislados. El número de SNPs de las 96 cepas restantes se aproximan al número de los que se encuentran en los estudios anteriormente mencionados lo que se puede interpretar como un brote con origen común y el hecho de que aparezcan ramas cortas y muy cercanas a la raíz es compatible con una expansión monoclonal reciente, aunque podría haber también algún caso de adquisición independiente (Kp50, Kp59 o Kp39). Excepto 10 cepas que sobrepasan los 20 SNPs, el resto son muy cercanas independientemente de la unidad de origen, e incluso del hospital. El hecho de que en el análisis topológico las cepas del H120 se encuentren distribuidas por el árbol sugiere que tanto estas cepas como las del HULP tienen un origen común. Esto indica que KpOXA-ST11 del HULP podría haber adquirido el plásmido portador de  $bla_{OXA-48}$  antes de llegar al hospital, y no dentro del hospital desde el ST405 que circulaba previamente. Aunque el brote de KpOXA en HULP es anterior al de H120, la aparición de KpOXA-ST11 es casi simultánea en ambos, lo que apoyaría esta interpretación.

## 2. Variabilidad en genes de resistencia y plásmidos

Los SNPs muestran la diversidad a nivel cromosómico. Pero estas cepas son portadoras de hasta 13 genes de resistencia distribuidos en varios plásmidos. Para estudiar la diversidad de los elementos extracromosómicos se hizo un mapeo sobre un fichero conteniendo los genes de resistencia identificados en Kp2 y las secuencias identificadoras de los plásmidos (*Inc*) en Kp2 y Kp1. Se observó que el plásmido *IncL/M* y el plásmido *IncFIB(K)* eran muy estables, mientras que el *IncR* se perdía con mayor frecuencia (hasta en el 17% de los aislados). De manera similar algunos genes de resistencia se perdían con frecuencia (ej.: TEM-116 que se pierde en el 51,4%) y otros se mantenían estables (ej.: CTXM-15 que se pierde en el 1.04%). La prevalencia del resto de genes de resistencia se encuentra por encima del 80%, y aunque en general se mantienen estables, es sorprendente la frecuencia con la que se pierden. Aunque las cepas estén estrechamente relacionadas no hay concordancia entre los genes de resistencia o plásmidos que se pierden y el lugar o la fecha en la que se aislaron las diferentes KpOXA-ST11.

A pesar de que en la mayoría de los casos la pérdida de genes de resistencia o plásmidos son eventos independientes existe un clado, el clado I, formado por trece cepas que tienen el mismo perfil de genes de resistencia, habiendo perdido el gen TEM-116 y QnrB1. Estas cepas están estrechamente relacionadas a nivel cromosómico (2 SNPs, excepto dos muestras con 67 SNPs que no son filogenéticamente informativos) con lo que se habla, en este caso, de una expansión clonal en un área bien definida ya que todas las muestras de este clado menos Kp33 pertenecen a la planta G02C. Este hecho se discutirá más en profundidad en el apartado 4. Por otro lado, se encuentran cepas que, teniendo un número pequeño de SNPs, difieren hasta en cinco genes de resistencia y en la pérdida de uno de los plásmidos (Kp115 y Kp117 o Kp42 y Kp54). Aunque hayan perdido el plásmido *IncFIB (K)* no tienen los mismos genes de resistencia. En general no hay una alta correlación entre los plásmidos *IncFIB(K)* e *IncR* y perfiles de genes de resistencia, lo que sugiere que los genes de resistencia se movilizan con frecuencia entre los plásmidos y el cromosoma y no están fuertemente asociados a ningún replicón. Una excepción sería el gen *bla<sub>OXA-48</sub>*, que sí está fuertemente asociado a *IncL/M*, aunque incluso en este caso se ha observado una excepción. Kp42 y Kp54, que se diferencian en 1 SNP, están relacionadas y los perfiles de genes de resistencia indican eventos independientes y posteriores a su divergencia. Todo lo contrario ocurre con cepas que teniendo 14 SNPs comparten el mismo

patrón de genes y plásmidos (Kp119 y Kp44) que sugieren que esas mutaciones son posteriores a la dispersión de este clon.

Por otro lado existen grupos pequeños de cepas (Kp45, Kp47, Kp46 y Kp84 o Kp74, Kp75 y Kp76) que teniendo un número pequeño o ningún SNP tampoco difieren en el patrón de resistencias lo que indica una expansión clonal.

En las cepas del H12O aparece la misma situación que se dan en el HULP. Por un lado, Kp123 y Kp124 aunque tienen 14 SNPs, han perdido TEM-116 y QnrB1 y poseen el resto de genes de resistencia. Pero también aparecen Kp115 y Kp117 que se diferencian en 2 SNPs pero tienen genes de resistencia diferentes. Kp34 y Kp43 del HULP han perdido *IncFIB(K)* mientras que en el H12O Kp115 es la única en perderlo.

En genética humana el estudio de variaciones en el número de copias tiene implicaciones en muchas enfermedades de herencia mendeliana o en algunos tipos de cáncer (166–168). Debido a este hecho han sido numerosos los programas de análisis que se han desarrollado con este fin (SegSeq(169), ReadDepth(170), BICseq(171), Patchwalk(172), OncoSNP-SEQ(173), HMMCOPY y CONserting), pero la mayoría siguen el mismo principio: cada lectura es una representación aleatoria del genoma, por lo que la media de lecturas de cada región debe ser proporcional a su abundancia y por lo tanto a su CN (174).

Un análisis preliminar sugería que existe variación de CN de plásmidos, IS y genes de resistencia dentro de los aislados, por eso se realizó el estudio de CN a partir del número de lecturas obtenidas por cepa y normalizando con el número de lecturas obtenidas en genes de copia única (ATPase, *mraW* y *ftsZ*). Se estimó el número de copias de cada uno de los plásmidos y genes de resistencia. En el caso de los plásmidos, el más variable era *IncL/M* y el menos variable *IncFIB(K)*. Los genes de resistencia que más variación presentaron son los genes de betalactamasas, siendo OXA-48 el más variable.

Para evaluar la reproducibilidad del método se secuenció una réplica de Kp124, en la cual se realizó la librería a partir de una dilución 1:10 del DNA extraído de Kp124, mostrando en todos los genes de resistencia analizados y plásmidos el mismo CN (Anexo 5). Se desconoce si esta variación en CN puede ser intrínseca a la cepa o un estado transitorio biológico. Sería interesante repetir el análisis de algunos aislados incluyendo varias réplicas biológicas. Además sería conveniente investigar si este fenómeno está asociado a eventos previos sufridos por la bacteria incluyendo crecimiento en diversos tejidos o en presencia de antibióticos.

### 3. IS como herramienta para aumentar la resolución del análisis genómico

El análisis de SNPs produce una imagen muy detallada de la estructura fina de la población, no obstante, en el caso de los brotes epidémicos en los que se obtiene un gran número de aislados en un período reducido de tiempo, este tipo de análisis puede estar limitado por la falta de variabilidad. Por ello se planteó explorar la utilidad de los elementos de inserción como herramienta para discriminar aislados que mediante análisis de SNPs no era posible.

Los elementos de inserción como marcadores filogenéticos ya se usan en otros microorganismos, como por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*. En este caso, desde que se desarrolló en 1990, el RFLP de *IS6110* se ha considerado mucho tiempo la técnica de referencia para discriminar entre las cepas de *M. tuberculosis* teniendo en cuenta el número y las posiciones en el cromosoma de este IS (175–178). Se han desarrollado protocolos en los que se analizan las zonas de inserción de *IS6110* mediante tecnología de Illumina, por ejemplo el estudio *IS-seq* (179) en el que se analizaron mas de 500 aislados fueron capaces de detectar casi 7.000 sitios de inserción de *IS6110*; validaron la técnica con cepas de referencia obteniendo el 100% de especificidad y un valor predictivo positivo del 98%.

El análisis de la variación en el número y la posición de los elementos de inserción *ISKpn1* (*IS3*) e *ISEcp1* (*IS1380*), que se encuentran en el cromosoma, mostró que mientras *ISKpn1* es muy estable y no aporta información, *ISEcp1* sí es suficientemente variable como para complementar al estudio de variantes únicas y ayudar en la resolución de las rutas de transmisión de diferentes patógenos por el hospital. Por ejemplo, en el caso de Kp96, Kp91, Kp82 y Kp97, estas cuatro, en los que el número de SNPs era demasiado bajo y el análisis filogenético no tenía capacidad de discriminación (aparecen las cuatro en la base del árbol), pueden relacionarse por un sitio único de inserción común.

Por otra parte, los IS plasmídicos se encuentran en números más altos y muestran mucha mayor variabilidad, sin embargo la mayoría se encuentran formando parte de transposones, en algunos casos en múltiples copias, o en regiones ricas en genes de resistencia y elementos móviles, y resulta muy difícil identificar sin ambigüedad los sitios de inserción.



## 4. Dinámica de la población de KpOXA-ST11 en dos unidades concretas

Como ya se comentó en el apartado 1, como mínimo existen dos eventos de transmisión del plásmido portador de OXA a Kp-ST11 en el complejo hospitalario del HULP, a Kp38, y al ancestro de todas las demás. El análisis de uno de ellos se interpreta como un brote con un origen común reciente que ha sufrido una expansión monoclonal aunque podría haber (o no pueden descartarse) algunos casos de adquisición independientes.

En la unidad G01I de los dos aislados obtenidos, Kp33 y Kp8, uno de ellos, Kp33, tiene relación con el clado I que pertenece a la unidad G02C, mientras que Kp8 no se asocia estrechamente a ningún otro aislado mediante SNPs ni con IS. Por otra parte, en la unidad IV05 se encontraron 4 aislados, 3 de ellos muy relacionados mediante SNPs, Kp30, Kp31 y Kp32 y uno que no se resuelve con el árbol consenso Kp18 que tiene 4 SNPs que no son filogenéticamente informativos con los anteriores. Este hecho se corresponde con un brote localizado y documentado en la UCI de neonatos (IV05) que ocurrió durante el año 2012. Un aislado de T04N y otro de M08C se parecen a los aislados en la unidad G02C. En la unidad G05C se recogen dos aislados muy relacionados entre ellos. De la unidad G03C se aíslan 5 KpOXA-ST11, Kp42 se relaciona por SNPs con aislados de la planta G02C y G08C. Los pacientes que están ingresados tanto en Cirugía Vascular (G02C) como en Nefrología (G08C) son pacientes con numerosas comorbilidades y con normalidad existe un flujo de pacientes con la planta G03C en la que se encuentra Cirugía General. A su vez, del resto de aislados de G03C, Kp1 se parece a Kp13 que pertenece a la G06D y Kp20, Kp43 y Kp81 no se relaciona con ninguna de las anteriores. Si se tiene en cuenta los IS hay otro grupo formado por 8 cepas que Kp77, Kp55, Kp56, Kp11, Kp35, Kp15 y Kp23, y Kp42 que se aíslan por distintas zonas del hospital, G02C, G08C, G14C, CBGE, G05D, G11C y G03C. Todos estos casos de aislados que se relacionan entre plantas, y aislados de la misma planta que no parecen tener relación entre ellas se corresponden con un flujo de eventos independientes de dispersión de las KpOXA-ST11 a lo largo de todo el complejo hospitalario sumado a pequeños brotes independientes dentro de cada unidad, como por ejemplo IV05, por esta razón se analizaron un número mayor de aislados en dos unidades diferentes del complejo hospitalario, G08C y G02C.

La unidad G08C incluye el Servicio de Nefrología, y ocasionalmente pacientes procedentes de otros servicios. En esta unidad los datos muestran una estructura epidémica de pequeños brotes mezclados con casos no relacionados. Hay al menos tres grupos independientes de KpOXA-ST11 que se aíslan a lo largo de los años 2013 y 2014. Kp105 y Kp93 que no tienen SNPs entre ellas, muestran probablemente un caso de llegada de un caso y posterior transmisión dentro de la planta. Pero también hay 16 aislados sin relación con otros casos de la planta, y que supondrían, al menos parte de ellos, reentradas independientes. Aunque algunos de ellos pudieron relacionarse por un elemento de inserción común y único, como es el caso de Kp96, Kp91, Kp82, que son idénticas y Kp97 con 2 SNPs con respecto a estas tres.

El Servicio de Cirugía vascular está en la planta 2 y es parte de la unidad funcional G02C. En esta unidad parece existir un brote sostenido en el tiempo, al menos durante un año y medio, en el cual estarían incluidas las doce cepas del clado I. También existen otro grupo de aislados que forman otro brote y que forman parte del clado X y por otro lado 16 casos aislados de ST11 que parecen más distantes y que serían, de nuevo, entradas independientes.

Mediante el análisis de elementos de inserción se observa que las cepas que forman parte del clado I, y otras dos, Kp64 y Kp65, también aisladas en este servicio y cercanas a las anteriores por SNPs, comparten un IS que aparece interrumpiendo el gen *mgrB*. Existen 6 aislados estrechamente relacionados, si complementamos en análisis con el estudio de IS este grupo aumenta hasta 14 aislados que pueden formar parte de un brote dentro de esta unidad. Estas cepas son resistentes a colistina (datos no mostrados), el hecho de que se identifiquen varios aislados estrechamente relacionados y que además comparten un IS que se asocia a una resistencia indica que esta inserción podría estar siendo seleccionada por presión antibiótica, la inserción podría haberse expandido clonalmente (clado I), pero también se habría transferido horizontalmente a otras cepas.

## 5. Protocolo para determinar la localización genómica de los IS mediante secuenciación masiva dirigida.

Con el objetivo de enriquecer el análisis genómico con información sobre los elementos de inserción se diseñó un protocolo de captura de híbridos. Los resultados obtenidos muestran que este protocolo es capaz de enriquecer en más de 30 veces las secuencias en las regiones de interés, aunque las secuencias que no forman parte de un elemento de inserción aún forman el 70% del total. Con respecto a la comparación de la extracción informática de IS y la captura de híbridos, esta última no fue capaz de detectar el 17% de las zonas de inserción probablemente debido a la baja profundidad obtenida en algunas de las secuencias de inserción.

Un problema que se observó fue que tanto en el gel de la PCR multiplex, como en la cobertura de los distintos IS existe una amplificación preferencial de unos IS frente a otros. Este hecho podría contrarrestarse con una optimización de parámetros como la temperatura de anillamiento o la concentración de oligos (180–182).

Una forma de intentar mejorar el rendimiento de la secuenciación y evitar un ratio tan alto de secuencias que no están enriquecidas podría ser aumentar la concentración de sonda de captura, diseñar más sondas de captura dirigiéndose a zonas de integración de los IS que se conocen gracias a la extracción informática de genomas completos o repetir eventos de lavados de secuencias previos a la realización de las librerías.

El análisis de los IS extraídos informáticamente de la secuenciación de genoma completo mostró que dos de los IS son plasmídicos, con lo cual se descartaron del análisis, y de los genómicos, uno de ellos presentaba muy poca variabilidad con lo que su utilidad para el estudio era muy baja. Por tanto, tres de los cuatro elementos estudiados realmente no hubieran aportado información, y podría realizarse una captura de híbridos dirigida únicamente a ISEcp1, que en el caso de KpOXA-ST11 parece el único informativo.

En los últimos años han surgido nuevas tecnologías diseñadas para solventar el problema que crea la secuenciación completa de genomas grandes como es la generación de

una gran cantidad de datos adicionales que pueden complicar el procesamiento y análisis de datos y el coste económico que conlleva (183). Estas técnicas de captura como Seq-Capture de Agilent o Nimblegen de Roche están desarrolladas o bien para la captura de secuencias en la que se buscan mutaciones en una secuencia conocida o bien para la captura de RNA mensajeros para realizar estudios de expresión. En este caso estas tecnologías no son aplicables ya que la secuencia que se desea capturar no es conocida.

Esta herramienta podría ser útil para el análisis de elementos móviles en bacterias si se optimiza el rendimiento de la captura, no obstante, el coste por muestra de la secuenciación de genomas bacterianos completos ha disminuido hasta el punto de que es más rentable y menos laboriosa la secuenciación de genomas completos y el análisis informático. Sin embargo, sí podría ser útil en el estudio de genomas más grandes en los que la secuenciación de genomas completos o los kits comerciales de captura de secuencias tienen todavía un precio elevado.

# Conclusiones



## Conclusiones:

- La estructura genética de la población de *K. pneumoniae* ST11 productora de carbapenemasa OXA-48 del HULP es una estructura oligoclonal, compuesta como mínimo por dos eventos independientes de adquisición del plásmido *IncL/M* portador de OXA-48 por *K. pneumoniae* ST11. En general la población de KpOXA-ST11 en el HULP es bastante homogénea debido a la expansión clonal de una de las entradas de KpOXA-ST11. Dentro de esta expansión pueden identificarse minibrotes dentro de una unidad y entradas repetidas desde el exterior.
- La dinámica de la población de ST11 dentro de la unidad G08C es parte de una estructura epidémica formada pequeños brotes mezclados con casos no relacionados probablemente debido al flujo de pacientes que recibe esta unidad de otras plantas. Sin embargo en la planta G02C hay entradas de casos que no se relacionan y un brote sostenido en el tiempo de KpOXA-ST11 resistente a colistina que pudo estar siendo seleccionado por el uso de este antibiótico.
- El protocolo desarrollado para la captura de secuencias es capaz de enriquecer la secuenciación en hasta 33 veces en IS y secuencias adyacentes, a pesar de esto la cantidad de ruido supera el 70%. El análisis informático de IS extraídos de WGS es una aproximación más sencilla y más barata a este procedimiento.
- El análisis de IS cromosómicos permite establecer relaciones entre aislados en casos en los que el análisis de SNPs no aporte mucha información si la población es muy homogénea.
- La variabilidad en el contenido de genes de resistencia, plásmidos e ISs fue muy elevado mostrando frecuentemente pérdidas de genes de resistencia y plásmidos y variabilidad en el CN de ISs, plásmidos y genes de resistencia.



# Bibliografía



# Bibliografía:

1. COWAN ST, STEEL KJ, SHAW C, DUGUID JP. 1960. A Classification of the Klebsiella Group. *J Gen Microbiol* 23:601–612.
2. Al-Hasan MN, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Baddour LM. 2010. Epidemiology and Outcome of Klebsiella Species Bloodstream Infection: A Population-Based Study. *Mayo Clin Proc* 85:139–144.
3. Podschun R, Ullmann U. 1998. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 11:589–603.
4. Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Liñares J, Ariza J, Gudiol F. 1998. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 42:53–8.
5. Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F. 2011. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in Klebsiella pneumoniae in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4398–401.
6. Fresnadillo Martínez MJ, García García MI, García Sánchez E, García Sánchez JE. 2010. Los carbapenems disponibles: Propiedades y diferencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28:53–64.
7. Ambler RP, Meadway RJ. 1969. Chemical structure of bacterial penicillinases. *Nature* 222:24–6.
8. Ke W, Bethel CR, Papp-Wallace KM, Pagadala SRR, Nottingham M, Fernandez D, Buynak JD, Bonomo RA, van den Akker F. 2012. Crystal Structures of KPC-2 -Lactamase in Complex with 3-Nitrophenyl Boronic Acid and the Penam Sulfone PSR-3-226. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2713–2718.
9. Poirel L, Potron A, Nordmann P. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 67:1597–606.
10. Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Gullans C, Pettinato B, Karumudi U, Tolaney P, Quale J. 2005. Emergence of KPC-Possessing Klebsiella pneumoniae in Brooklyn, New



- York: Epidemiology and Recommendations for Detection. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3018–3020.
11. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. 2005. Rapid Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. *Arch Intern Med* 165:1430.
  12. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. 2009. Characterization of a New Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 53:5046–5054.
  13. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:15–22.
  14. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. 2015. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance: TABLE 1. *Antimicrob Agents Chemother* 59:5873–5884.
  15. Garcia-Fernandez A, Villa L, Carta C, Venditti C, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A. 2012. *Klebsiella pneumoniae* ST258 Producing KPC-3 Identified in Italy Carries Novel Plasmids and OmpK36/OmpK35 Porin Variants. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2143–2145.
  16. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. 2014. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol* 22:686–696.
  17. Naas T, Cuzon G, Villegas M-V, Lartigue M-F, Quinn JP, Nordmann P. 2008. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the  $\beta$ -Lactamase blaKPC Gene. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1257–1263.
  18. Lee C-R, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. 2016. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol* 7:895.
  19. Toleman MA, Spencer J, Jones L, Walsh TR. 2012. blaNDM-1 Is a Chimera Likely

- Constructed in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2773–2776.
20. Hudson CM, Bent ZW, Meagher RJ, Williams KP. 2014. Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain. *PLoS One* 9:e99209.
  21. Hishinuma A, Yoshida A, Suzuki H, Okuzumi K, Ishida T. 2013. Complete sequencing of an IncFII NDM-1 plasmid in *Klebsiella pneumoniae* shows structural features shared with other multidrug resistance plasmids. *J Antimicrob Chemother* 68:2415–2417.
  22. Studentova V, Dobiasova H, Hedlova D, Dolejska M, Papagiannitsis CC, Hrabak J. 2015. Complete Nucleotide Sequences of Two NDM-1-Encoding Plasmids from the Same Sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* Strain. *Antimicrob Agents Chemother* 59:1325–1328.
  23. Villa L, Poirel L, Nordmann P, Carta C, Carattoli A. 2012. Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the blaNDM-1, blaCTX-M-15 and qnrB1 genes. *J Antimicrob Chemother* 67:1645–1650.
  24. Chen C-J, Wu T-L, Lu P-L, Chen Y-T, Fung C-P, Chuang Y-C, Lin J-C, Siu LK. 2014. Closely Related NDM-1-Encoding Plasmids from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS One* 9:e104899.
  25. Peirano G, Ahmed-Bentley J, Fuller J, Rubin JE, Pitout JDD. 2014. Travel-Related Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria in Alberta, Canada: the First 3 Years. *J Clin Microbiol* 52:1575–1581.
  26. Wang X, Xu X, Li Z, Chen H, Wang Q, Yang P, Zhao C, Ni M, Wang H. 2014. An Outbreak of a Nosocomial NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 at a Teaching Hospital in Mainland China. *Microb Drug Resist* 20:144–149.
  27. Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. 2008. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2950–4.
  28. Aubert D, Naas T, Héritier C, Poirel L, Nordmann P. 2006. Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of beta-lactam resistance genes. *J Bacteriol* 188:6506–14.
  29. Naas T, Poirel L, Karim A, Nordmann P. 1999. Molecular characterization of In50, a class

- 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 176:411–9.
30. Potron A, Poirel L, Nordmann P. 2014. Derepressed transfer properties leading to the efficient spread of the plasmid encoding carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* 58:467–71.
31. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. 2013. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 13:785–96.
32. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. 2011. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* 11:355–362.
33. Giani T, Pini B, Arena F, Conte V, Bracco S, Migliavacca R, AMCLI-CRE Survey Participants, Pantosti A, Pagani L, Luzzaro F, Rossolini GM. 2013. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. *Euro Surveill* 18.
34. Bowers JR, Kitchel B, Driebe EM, MacCannell DR, Roe C, Lemmer D, de Man T, Rasheed JK, Engelthaler DM, Keim P, Limbago BM. 2015. Genomic Analysis of the Emergence and Rapid Global Dissemination of the Clonal Group 258 *Klebsiella pneumoniae* Pandemic. *PLoS One* 10:e0133727.
35. Adler A, Hussein O, Ben-David D, Masarwa S, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y, Setton E, Golan S, Brill S, Lipkin V, Frodin E, Mendelson G, Rave R, Yehuda N, Aizen I, Kaganski M, Gershkovich P, Sasson A, Yosef H, Stessman J, Zlatkin S, Or I, Lazary A, Weinberg I, Madjar J, Taichman S, Ben-Israel J, Vigder C, Bar’el C, Davidovitch Y, Charish L. 2015. Persistence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 as the predominant clone of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in post-acute-care hospitals in Israel, 2008-13. *J Antimicrob Chemother* 70:89–92.
36. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. 2011. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol* 19:588–595.
37. Falagas ME, Rafailidis PI, Kofteridis D, Vrtzili S, Chelvatzoglu FC, Papaioannou V,

- Maraki S, Samonis G, Michalopoulos A. 2007. Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case control study. *J Antimicrob Chemother* 60:1124–1130.
38. Bharadwaj R, Joshi S, Dohe V, Gaikwad V, Kulkarni G, Shouche Y. 2012. Prevalence of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM-1)-positive bacteria in a tertiary care centre in Pune, India. *Int J Antimicrob Agents* 39:265–266.
  39. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar A V, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 10:597–602.
  40. Berrazeg M, Diene S, Medjahed L, Parola P, Drissi M, Raoult D, Rolain J. 2014. New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: an eReview using Google Maps. *Euro Surveill* 19.
  41. Jin Y, Shao C, Li J, Fan H, Bai Y, Wang Y. 2015. Outbreak of Multidrug Resistant NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* from a Neonatal Unit in Shandong Province, China. *PLoS One* 10:e0119571.
  42. Robert J, Pantel A, Merens A, Lavigne J-P, Nicolas-Chanoine M-H, Brieu N, Vrain A, Scanvic A, Porcheret H, Garnier P, Bertrand X, Descamps D, Hombrouck C, Soullie B, Heym B, de Montclos H, Garrec H, Levast M, Mendes-Martins L, Decousser JW, Huet C, Bert F, Herzig V, Klein JP, Nebbad B, Hendricx S, Verhaeghe A, Lafaurie C, Lanselle C, Elsayed F, Carrer A, Drieux-Rouzet L, Evreux F, Varache C, Wallet F, Martin C, Le-Bris JM, Moulhade MC, Deville E, Menouni O, Jean-Pierre H, Pierrot P, Delarbre JM, Coude B, Foca M, Degand N, Prots L, Pantel A, Adam MN, Laurens E, Raskine L, Laouira S, Arlet G, Sanchez R, Peuchant O, Grau V, Laurent C, De-Champs C, Vachee A, Harriau P, Merens A, Belmonte O, Michel G, Henry C, Picot S, Glatz I, Gueudet T, Honderlick P, Cavalie L, Galinier JL, Patoz P, van-der-Mee-Marquet N, Haguenoer E, Canis F, Kassis-Chikhany N, Le-Garrec Y. 2014. Incidence rates of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011-12. *J Antimicrob Chemother* 69:2706–2712.

43. Beyrouthy R, Robin F, Dabboussi F, Mallat H, Hamzé M, Bonnet R. 2014. Carbapenemase and virulence factors of Enterobacteriaceae in North Lebanon between 2008 and 2012: evolution via endemic spread of OXA-48. *J Antimicrob Chemother* 69:2699–2705.
44. Shibl A, Al-Agamy M, Memish Z, Senok A, Khader SA, Assiri A. 2013. The emergence of OXA-48- and NDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. *Int J Infect Dis* 17:e1130–e1133.
45. Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JDD. 2013. Surveillance and Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Isolates That Produce Carbapenemases: First Report of OXA-48-Like Enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 57:130–136.
46. Lixandru BE, Cotar AI, Straut M, Usein CR, Cristea D, Ciontea S, Tatu-Chitoiu D, Codita I, Rafila A, Nica M, Buzea M, Baicus A, Ghita MC, Nistor I, Tuchiluş C, Indreas M, Antohe F, Glasner C, Grundmann H, Jasir A, Damian M. 2015. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Romania: A Six-Month Survey. *PLoS One* 10:e0143214.
47. Oteo J, Hernandez JM, Espasa M, Fleites A, Saez D, Bautista V, Perez-Vazquez M, Fernandez-Garcia MD, Delgado-Iribarren A, Sanchez-Romero I, Garcia-Picazo L, Miguel MD, Solis S, Aznar E, Trujillo G, Mediavilla C, Fontanals D, Rojo S, Vindel A, Campos J. 2013. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother* 68:317–321.
48. Brañas P, Villa J, Viedma E, Mingorance J, Orellana MA, Chaves F. 2015. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Madrid: Successful establishment of an OXA-48 ST11 clone. *Int J Antimicrob Agents* 46:111–116.
49. Ruiz-Garbajosa P, Curiao T, Tato M, Gijon D, Pintado V, Valverde A, Baquero F, Morosini MI, Coque TM, Canton R. 2013. Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. *J Antimicrob Chemother* 68:2487–2492.
50. Guo L, An J, Ma Y, Ye L, Luo Y, Tao C, Yang J, Pitout J, Nordmann P, Poirel L, Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P, Poirel L, Potron A, Nordmann P, Vaux S, Carbonne A, Thiolet J, Jarlier V, Coignard B, Dautzenberg M, Ossewaarde J, Kraker M de, Zee A van

- der, Burgh S van, Greeff S de, Dortet L, Oueslati S, Jeannot K, Tande D, Naas T, Nordmann P, Evans B, Amyes S, Oueslati S, Nordmann P, Poirel L, Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos D, Vriani G, Mamali V, Liapis E, Pantel A, Robert J, Nicolas-Chanoine M, Cavalie L, Mee-Marquet N van der, Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P, Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P, Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland K, Pitout J, Oteo J, Hernandez J, Espasa M, Fleites A, Saez D, Bautista V, Ma L, Wang J, Wu T, Siu L, Chuang Y, Lin J, Poirel L, Bonnin R, Nordmann P, Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay A, Badur S, Nordmann P, Giani T, Conte V, Pilato V Di, Aschbacher R, Weber C, Larcher C, Potron A, Nordmann P, Rondinaud E, Jauregui F, Poirel L, Dallenne C, Costa A Da, Decre D, Favier C, Arlet G, Lee C, Chu C, Liu J, Chen Y, Chiu C, Su L, Yang J, Ye L, Guo L, Zhao Q, Chen R, Tian S, Johnson T, Wannemuehler Y, Johnson S, Logue C, White D, Doetkott C, Johnson T, Bielak E, Fortini D, Hansen L, Hasman H, Debroy C, Chen L, Hu H, Chavda K, Zhao S, Liu R, Liang H, Chen L, Laham N Al, Chavda K, Mediavilla J, Jacobs M, Bonomo R, Daikos G, Tsaousi S, Tzouvelekis L, Anyfantis I, Psychogiou M, Argyropoulou A, Dimou V, Dhanji H, Pike R, Livermore D, Woodford N, Papagiannitsis C, Giakkoupi P, Vatopoulos A, Tryfinopoulou K, Miriagou V, Tzouvelekis L, Samuelsen O, Toleman M, Hasseltvedt V, Fuursted K, Leegaard T, Walsh T, Papagiannitsis C, Izdebski R, Baraniak A, Fiett J, Herda M, Hrabák J, Gottig S, Gruber T, Stecher B, Wichelhaus T, Kempf V. 2016. Nosocomial Outbreak of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese Hospital: Clonal Transmission of ST147 and ST383. *PLoS One* 11:e0160754.
51. Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vriani G, Mamali V, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. 2013. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J Antimicrob Chemother* 68:84–88.
  52. Hrabák J, Študentová V, Jakubů V, Adámková V, Dvořáková L, Balejova M, Bergerová T, Chmelařová E, Ježek P, Kabelíková P, Kolář M, Paterová P, Tejkalová R, Papagiannitsis C, Žemličková H. 2015. Prevalence study on carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Czech hospitals--results from Czech Part of European Survey on Carbapenemase--Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE). *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 64:87–91.
  53. Lafeuille E, Decré D, Mahjoub-Messai F, Bidet P, Arlet G, Bingen E. 2013. OXA-48 Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Libyan Patients. *Microb Drug Resist* 19:491–497.

54. Gottig S, Gruber TM, Stecher B, Wichelhaus TA, Kempf VAJ. 2015. In Vivo Horizontal Gene Transfer of the Carbapenemase OXA-48 During a Nosocomial Outbreak. *Clin Infect Dis* 60:1808–1815.
55. Osterblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. 2012. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Finland: the first years (2008-11). *J Antimicrob Chemother* 67:2860–2864.
56. Liapis E, Pantel A, Robert J, Nicolas-Chanoine M-H, Cavalié L, van der Mee-Marquet N, de Champs C, Aissa N, Eloy C, Blanc V, Guyeux C, Hocquet D, Lavigne J-P, Bertrand X, On behalf of ONERBA. 2014. Molecular epidemiology of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in France. *Clin Microbiol Infect* 20:O1121–O1123.
57. Hashimoto A, Nagamatsu M, Ohmagari N, Hayakawa K, Kato Y, Kirikae T. 2014. Isolation of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST101 from an overseas traveler returning to Japan. *Jpn J Infect Dis* 67:120–1.
58. Arana DMM, Saez D, García-Hierro P, Bautista V, Fernández-Romero S, Ángel de la Cal M, Alós JII, Oteo J. Concurrent interspecies and clonal dissemination of OXA-48 carbapenemase. *Clin Microbiol Infect* 21:148.e1-148.e4.
59. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. 2013. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase- producing Enterobacteriaceae over a 11-year period. *Euro Surveill* 18.
60. Miró E, Agüero J, Larrosa MN, Fernández A, Conejo MC, Bou G, González-López JJ, Lara N, Martínez-Martínez L, Oliver A, Aracil B, Oteo J, Pascual A, Rodríguez-Baño J, Zamorano L, Navarro F. 2013. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC  $\beta$ -lactamases and carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32:253–259.
61. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M, González-López JJ, Martínez-García L, Martínez-Martínez L, Merino M, Miró E, Mora M, Navarro F, Oliver A, Pascual Á, Rodríguez-Baño J, Ruiz-Carrascoso G, Ruiz-Garbajosa P, Zamorano L, Bautista V, Pérez-Vázquez M, Campos J, GEIH-GEMARA (SEIMC) and REIPI. 2015. Prospective Multicenter Study of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae from 83 Hospitals in Spain Reveals High *In Vitro* Susceptibility to Colistin and Meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 59:3406–3412.
62. Palacios-Baena ZR, Oteo J, Conejo C, Larrosa MN, Bou G, Fernández-Martínez M,

- González-López JJ, Pintado V, Martínez-Martínez L, Merino M, Pomar V, Mora-Rillo M, Rivera MA, Oliver A, Ruiz-Carrascoso G, Ruiz-Garbajosa P, Zamorano L, Bautista V, Ortega A, Morales I, Pascual Á, Campos J, Rodríguez-Baño J, Zaballos Á, Cantón R, Martínez-García L, Fleites AM, Rodríguez-Lucas C, Sánchez-Romero MI, García-Picazo L, Aznar E, Campelo C, González-Praetorius A, Solís S, Giner S, Salavert M, Hernández JM, Pujals JV, Bastarras AV, Orellana MÁ, Cercenado E, Espasa M, Fontanals D, García-López MV, Hernández-Almaraz JL, Martí-Sala C, Gimeno A, Alarcón T, Llorca L, Segura C, Clivillé-Abad R, Motjé M, García i Parés D, de la Iglesia P, Iglesias B, Castón J, Romero MD, Rodríguez-Polo JA, Trujillo G, Morta M, Setas AG, Ezpeleta C, Miguel-Martínez MD, Sánchez-Porto A, Casas J, Molina D, Garduño E, Alados JC, Pérez-Jové P, Sauca G, Gallés C, Galánand F, Guerrero F, Brezmes MF, Ortega MP, Castillo FJ, Seral C, Delgado-Iribarren A, Yagüe A, Aspiroz C, Fernández-Natal MI, Wilhelmi I, Reyes P, Pérez-Ramírez MD, Cuesta I, Pérez Moreno MO, García A, Ballester F, Pujol I, Sierra M, González-Cuevas A, García PL, Saladrigas LC, Martínez-López J, Martínez-Lamas L, Cabrera JJ, de Cruz SG, Raya C, Campo AB, de Benito I, Canut A, Berdonces P, Lecaroz Agara MC, Real SH, Hernández B, Ledo MT, El Knaichi F, Tejero CG, Azcona JM, Ferrer I, Lamata M, Pazos C, Chocarro MP, Murillas J, Miró E, Navarro F, Bartolomé RM. 2016. Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain. *J Infect* 72:152–160.
63. Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernandez-Romero S, Hernandez-Molina JM, Perez-Vazquez M, Aracil B, Campos J, Spanish Collaborating Group for the Antibiotic Resistance Surveillance Program. 2013. Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother* 57:6344–6347.
  64. Tóth Á, Damjanova I, Puskás E, Jánvári L, Farkas M, Dobák A, Böröcz K, Pásztí J. 2010. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29:765–769.
  65. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35:736–755.
  66. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. 2014. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol* 22:686–696.



67. Paño-Pardo JR, López Quintana B, Lázaro Perona F, Ruiz Carrascoso G, Romero-Gómez MP, Loeches Yagüe B, Díaz-Pollán B, Martínez-Virto A, Mingorance J, García Rodríguez J, Arribas JR, Gómez-Gil R. 2016. Community-Onset Bloodstream and Other Infections, Caused by Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* : Epidemiological, Microbiological, and Clinical Features. *Open Forum Infect Dis* 3:ofw136.
68. Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E, Synnestvedt M, Fishman NO. 2009. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30:1180–5.
69. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. 2008. Isolation of Imipenem-Resistant *Enterobacter* Species: Emergence of KPC-2 Carbapenemase, Molecular Characterization, Epidemiology, and Outcomes. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1413–1418.
70. Papadimitriou-Olivgeris M, Marangos M, Fligou F, Christofidou M, Bartzavali C, Anastassiou ED, Filos KS. 2012. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization upon ICU admission. *J Antimicrob Chemother* 67:2976–2981.
71. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. 2008. Outcomes of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection and the Impact of Antimicrobial and Adjunctive Therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29:1099–1106.
72. Gagliotti C, Giordani S, Ciccarese V, Barozzi A, Giovinnazzi A, Pietrantonio AM, Moro ML, Pinelli G, Sarti M. 2014. Risk factors for colonization with carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospital: A matched case-control study. *Am J Infect Control* 42:1006–1008.
73. Otero RM, Noriega ER, De Revisión A, Ruiz Sánchez F. 1999. Enterobacterias con betalactamasas de espectro extendido: su importancia como patógenos nosocomiales. *Enfermedades Infecc y Microbiol Vol ENF INFEC Y MICROBIOL* 1919:116–32.
74. Legras A, Malvy D, Quinioux AI, Villers D, Bouachour G, Robert R, Thomas R. 1998. Nosocomial infections: prospective survey of incidence in five French intensive care units. *Intensive Care Med* 24:1040–6.
75. Cruse PJ, Foord R. 1973. A five-year prospective study of 23,649 surgical wounds. *Arch Surg* 107:206–10.

76. Dierssen T, Vicente P, Seco JL, Rodrigo I, Delgado-Rodríguez M. 1996. [Risk factors associated with the development of surgical wound infection in a general surgery service]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 14:240–4.
77. Caulley L, Johnson-Obaseki S, Luo L, Javidnia H. 2017. Risk factors for postoperative complications in total thyroidectomy. *Medicine (Baltimore)* 96:e5752.
78. Northey D, Adess ML, Hartsuck JM, Rhoades ER. 1974. Microbial surveillance in a surgical intensive care unit. *Surg Gynecol Obstet* 139:321–5.
79. Rioja Artal S, Florit López S, Herranz Pinilla C, Solanich Valldaura T, González Cañas E, Gimenez Gaibar A. 2016. Factores predictivos de infección de herida quirúrgica en cirugía arterial de extremidades inferiores. *Angiología* 68:180–186.
80. Braga M, Vignali A, Radaelli G, Gianotti L, Di Carlo V. 1992. Association between perioperative blood transfusion and postoperative infection in patients having elective operations for gastrointestinal cancer. *Eur J Surg* 158:531–6.
81. Ford CD, VanMoorleghe G, Menlove RL. 1993. Blood transfusions and postoperative wound infection. *Surgery* 113:603–7.
82. Mariappan S, Sekar U, Kamalanathan A. 2017. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Int J Appl basic Med Res* 7:32–39.
83. Swaminathan M, Sharma S, Blash SP, Patel G, Banach DB, Phillips M, LaBombardi V, Anderson KF, Kitchel B, Srinivasan A, Calfee DP. 2013. Prevalence and Risk Factors for Acquisition of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in the Setting of Endemicity. *Infect Control Hosp Epidemiol* 34:809–817.
84. Ling ML, Tee YM, Tan SG, Amin IM, How KB, Tan KY, Lee LC. 2015. Risk factors for acquisition of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in an acute tertiary care hospital in Singapore. *Antimicrob Resist Infect Control* 4:26.
85. Chang H-J, Hsu P-C, Yang C-C, Kuo A-J, Chia J-H, Wu T-L, Lee M-H. 2011. Risk factors and outcomes of carbapenem-nonsusceptible *Escherichia coli* bacteremia: A matched case–control study. *J Microbiol Immunol Infect* 44:125–130.
86. Wang Q, Zhang Y, Yao X, Xian H, Liu Y, Li H, Chen H, Wang X, Wang R, Zhao C, Cao B, Wang H. 2016. Risk factors and clinical outcomes for carbapenem-resistant

- Enterobacteriaceae nosocomial infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35:1679–1689.
87. Maseda E, Salgado P, Anillo V, Ruiz-Carrascoso G, Gómez-Gil R, Martín-Funke C, Gimenez M-J, Granizo J-J, Aguilar L, Gilsanz F. 2017. Risk factors for colonization by carbapenemase-producing enterobacteria at admission to a Surgical ICU: A retrospective study. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 35:333–337.
  88. Dautzenberg MJ, Ossewaarde JM, de Kraker ME, van der Zee A, van Burgh S, de Greeff SC, Bijlmer HA, Grundmann H, Cohen Stuart JW, Fluit AC, Troelstra A, Bonten MJ. 2014. Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing Enterobacteriaceae in the Netherlands, 2009 to 2011. *Euro Surveill* 19.
  89. Dautzenberg MJD, Ossewaarde JM, de Greeff SC, Troelstra A, Bonten MJM. 2016. Risk factors for the acquisition of OXA-48-producing Enterobacteriaceae in a hospital outbreak setting: a matched case–control study. *J Antimicrob Chemother* 71:2273–2279.
  90. Madueño A, González García J, Ramos MJ, Pedroso Y, Díaz Z, Oteo J, Lecuona M. 2017. Risk factors associated with carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* fecal carriage: A case–control study in a Spanish tertiary care hospital. *Am J Infect Control* 45:77–79.
  91. Fernández Cuenca F, López Cerero L, Pascual Hernández Á. 2013. Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 31:20–25.
  92. Jolley KA, Chan M-S, Maiden MC. 2004. mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* 5:86.
  93. Foley SL, Lynne AM, Nayak R. 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens ☆. *Infect Genet Evol* 9:430–440.
  94. Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18:7213–8.
  95. Singh A, Goering R V., Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. 2006. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clin Microbiol Rev* 19:512–530.
  96. Eckert C, Van Broeck J, Spigaglia P, Burghoffer B, Delmée M, Mastrantonio P, Barbut F.

2011. Comparison of a commercially available repetitive-element PCR system (DiversiLab) with PCR ribotyping for typing of *Clostridium difficile* strains. *J Clin Microbiol* 49:3352–4.
97. Decker BK, Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Hall GS, Jacobs MR, Gebreyes WA, Zoll ST, Massire C, Eshoo MW, Ecker DJ, Rather PN, Bonomo RA. 2012. Longitudinal Analysis of the Temporal Evolution of *Acinetobacter baumannii* Strains in Ohio, USA, by Using Rapid Automated Typing Methods. *PLoS One* 7:e33443.
  98. Loman NJ, Constantinidou C, Chan JZM, Halachev M, Sergeant M, Penn CW, Robinson ER, Pallen MJ. 2012. High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nat Rev Microbiol* 10:599–606.
  99. Tang P, Croxen MA, Hasan MR, Hsiao WWL, Hoang LM. 2017. Infection control in the new age of genomic epidemiology. *Am J Infect Control* 45:170–179.
  100. Harris SR, Clarke IN, Seth-Smith HMB, Solomon AW, Cutcliffe LT, Marsh P, Skilton RJ, Holland MJ, Mabey D, Peeling RW, Lewis DA, Spratt BG, Unemo M, Persson K, Bjartling C, Brunham R, de Vries HJC, Morré SA, Speksnijder A, Bébéar CM, Clerc M, de Barbeyrac B, Parkhill J, Thomson NR. 2012. Whole-genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nat Genet* 44:413–9, S1.
  101. Harris SR, Feil EJ, Holden MTG, Quail MA, Nickerson EK, Chantratita N, Gardete S, Tavares A, Day N, Lindsay JA, Edgeworth JD, de Lencastre H, Parkhill J, Peacock SJ, Bentley SD. 2010. Evolution of MRSA During Hospital Transmission and Intercontinental Spread. *Science* (80- ) 327:469–474.
  102. Roer L, Hansen F, Thomsen MCF, Knudsen JD, Hansen DS, Wang M, Samulionienė J, Justesen US, Røder BL, Schumacher H, Østergaard C, Andersen LP, Dzajic E, Søndergaard TS, Stegger M, Hammerum AM, Hasman H. 2017. WGS-based surveillance of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from bloodstream infections in Denmark. *J Antimicrob Chemother*.
  103. Cody AJ, Bray JE, Jolley KA, McCarthy ND, Maiden MCJ. 2017. A core genome multi-locus sequence typing scheme for stable, comparative analyses of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* human disease isolates. *J Clin Microbiol JCM.00080-17*.
  104. THOMPSON CK, WANG Q, BAG SK, FRANKLIN N, SHADBOLT CT, HOWARD P, FEARNLEY

- EJ, QUINN HE, SINTCHENKO V, HOPE KG. 2017. Epidemiology and whole genome sequencing of an ongoing point-source *Salmonella* Agona outbreak associated with sushi consumption in western Sydney, Australia 2015. *Epidemiol Infect* 1–10.
105. Köser CU, Holden MTG, Ellington MJ, Cartwright EJP, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, Hsu LY, Chewapreecha C, Croucher NJ, Harris SR, Sanders M, Enright MC, Dougan G, Bentley SD, Parkhill J, Fraser LJ, Betley JR, Schulz-Trieglaff OB, Smith GP, Peacock SJ. 2012. Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. *N Engl J Med* 366:2267–75.
  106. Zhou H, Liu W, Qin T, Liu C, Ren H. 2017. Defining and Evaluating a Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for Whole-Genome Sequence-Based Typing of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol* 8:371.
  107. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. 2014. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol* 22:686–96.
  108. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, Jenney A, Connor TR, Hsu LY, Severin J, Brisse S, Cao H, Wilksch J, Gorrie C, Schultz MB, Edwards DJ, Nguyen K Van, Nguyen TV, Dao TT, Mensink M, Minh V Le, Nhu NTK, Schultsz C, Kuntaman K, Newton PN, Moore CE, Strugnell RA, Thomson NR. 2015. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci* 112:E3574–E3581.
  109. Lawson DJ, Hellenthal G, Myers S, Falush D. 2012. Inference of Population Structure using Dense Haplotype Data. *PLoS Genet* 8:e1002453.
  110. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, Grimont P. 2009. Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. *PLoS One* 4:e4982.
  111. Wyres KL, Gorrie C, Edwards DJ, Wertheim HFL, Hsu LY, Van Kinh N, Zadoks R, Baker S, Holt KE. 2015. Extensive Capsule Locus Variation and Large-Scale Genomic Recombination within the *Klebsiella pneumoniae* Clonal Group 258. *Genome Biol Evol* 7:1267–1279.
  112. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. 2005. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 43:4178–82.

113. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. 2013. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 13:785–796.
114. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. 2015. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother* 59:5873–84.
115. Damjanova I, Toth A, Paszti J, Hajbel-Vekony G, Jakab M, Berta J, Milch H, Fuzi M. 2008. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new “MRSA”? *J Antimicrob Chemother* 62:978–985.
116. Lauderdale T-L, Shi Z-Y, Lin C-F, Lai J-F, Tan M-C, Wang J-T, Chang S-C. 2012. KPC-2-producing sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* detected in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2207–8.
117. Villa J, Viedma E, Brañas P, Mingorance J, Chaves F. 2014. Draft Whole-Genome Sequence of OXA-48-Producing Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* KP\_ST11\_OXA-48. *Genome Announc* 2:737–14.
118. Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. 2013. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J Antimicrob Chemother* 68:84–88.
119. Pena I, Picazo JJ, Rodríguez-Avial C, Rodríguez-Avial I. 2014. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. *Int J Antimicrob Agents* 43:460–464.
120. Pérez-Vázquez M, Oteo J, García-Cobos S, Aracil B, Harris SR, Ortega A, Fontanals D, Hernández JM, Solís S, Campos J, Dougan G, Kingsley RA. 2016. Phylogeny, resistome and mobile genetic elements of emergent OXA-48 and OXA-245 *Klebsiella pneumoniae* clones circulating in Spain. *J Antimicrob Chemother* 71:887–896.
121. Ma L, Wang J-T, Wu T-L, Siu LK, Chuang Y-C, Lin J-C, Lu M-C, Lu P-L. 2015. Emergence of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS One* 10:e0139152.

122. Chen L, Mathema B, Pitout JDD, DeLeo FR, Kreiswirth BN. 2014. Epidemic *Klebsiella pneumoniae* ST258 Is a Hybrid Strain. *MBio* 5:e01355-14-e01355-14.
123. Wyres KL, Holt KE. 2016. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. *Trends Microbiol* 24:944–956.
124. Partridge SR. 2011. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 35:820–855.
125. Casacuberta E, González J. 2013. The impact of transposable elements in environmental adaptation. *Mol Ecol* 22:1503–1517.
126. Hartl DL, Dykhuizen DE, Miller RD, Green L, de Framond J. 1983. Transposable element IS50 improves growth rate of *E. coli* cells without transposition. *Cell* 35:503–10.
127. Elena SF, Ekunwe L, Hajela N, Oden SA, Lenski RE. 1998. Distribution of fitness effects caused by random insertion mutations in *Escherichia coli*. *Genetica* 102/103:349–358.
128. Bichsel M, Barbour AD, Wagner A. 2010. The early phase of a bacterial insertion sequence infection. *Theor Popul Biol* 78:278–288.
129. Poirel L, Decousser J-W, Nordmann P. 2003. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla(CTX-M) beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2938–45.
130. Lartigue M-F, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. 2006. In Vitro Analysis of ISEcp1B-Mediated Mobilization of Naturally Occurring -Lactamase Gene blaCTX-M of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1282–1286.
131. Zong Z, Partridge SR, Iredell JR. 2010. ISEcp1-mediated transposition and homologous recombination can explain the context of bla(CTX-M-62) linked to qnrB2. *Antimicrob Agents Chemother* 54:3039–42.
132. Lartigue M-F, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. 2006. In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring beta-lactamase gene blaCTX-M of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1282–6.
133. Poirel L, Lartigue M-F, Decousser J-W, Nordmann P. 2005. ISEcp1B-mediated transposition of blaCTX-M in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:447–50.
134. Wachino J, Yamane K, Kimura K, Shibata N, Suzuki S, Ike Y, Arakawa Y. 2006. Mode of

- transposition and expression of 16S rRNA methyltransferase gene *rmtC* accompanied by ISEcp1. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3212–5.
135. Verdet C, Gautier V, Chachaty E, Ronco E, Hidri N, Decré D, Arlet G. 2009. Genetic context of plasmid-carried *bla*CMY-2-like genes in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 53:4002–6.
  136. Welch TJ, Fricke WF, McDermott PF, White DG, Rosso M-L, Rasko DA, Mammel MK, Eppinger M, Rosovitz MJ, Wagner D, Rahalison L, LeClerc JE, Hinshaw JM, Lindler LE, Cebula TA, Carniel E, Ravel J. 2007. Multiple Antimicrobial Resistance in Plague: An Emerging Public Health Risk. *PLoS One* 2:e309.
  137. Call DR, Singer RS, Meng D, Broschat SL, Orfe LH, Anderson JM, Herndon DR, Kappmeyer LS, Daniels JB, Besser TE. 2010. *bla*CMY-2-positive *IncA/C* plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are a distinct component of a larger lineage of plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 54:590–6.
  138. Schwartz E, Kröger M, Rak B. 1988. IS150: distribution, nucleotide sequence and phylogenetic relationships of a new *E. coli* insertion element. *Nucleic Acids Res* 16:6789–802.
  139. Prère MF, Chandler M, Fayet O. 1990. Transposition in *Shigella dysenteriae*: isolation and analysis of IS911, a new member of the IS3 group of insertion sequences. *J Bacteriol* 172:4090–9.
  140. Fayet O, Ramond P, Polard P, Prère MF, Chandler M. 1990. Functional similarities between retroviruses and the IS3 family of bacterial insertion sequences? *Mol Microbiol* 4:1771–7.
  141. Chandler M, Fayet O. 1993. Translational frameshifting in the control of transposition in bacteria. *Mol Microbiol* 7:497–503.
  142. Khan E, Mack JP, Katz RA, Kulkosky J, Skalka AM. 1991. Retroviral integrase domains: DNA binding and the recognition of LTR sequences. *Nucleic Acids Res* 19:851–60.
  143. Sekine Y, Izumi K, Mizuno T, Ohtsubo E. 1997. Inhibition of transpositional recombination by *OrfA* and *OrfB* proteins encoded by insertion sequence IS3. *Genes Cells* 2:547–57.
  144. Sekine Y, Eisaki N, Ohtsubo E. 1994. Translational Control in Production of Transposase



- and in Transposition of Insertion Sequence IS3. *J Mol Biol* 235:1406–1420.
145. Wilde C, Bachellier S, Hofnung M, Clement J-M. 2001. Transposition of IS1397 in the Family Enterobacteriaceae and First Characterization of ISKpn1, a New Insertion Sequence Associated with *Klebsiella pneumoniae* Palindromic Units. *J Bacteriol* 183:4395–4404.
  146. Johnsrud L. 1979. DNA sequence of the transposable element IS1. *Mol Gen Genet* 169:213–8.
  147. Ohtsubo H, Ohtsubo E. 1978. Nucleotide sequence of an insertion element, IS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:615–9.
  148. Zerbib D, Jakowec M, Prentki P, Galas DJ, Chandler M. 1987. Expression of proteins essential for IS1 transposition: specific binding of InsA to the ends of IS1. *EMBO J* 6:3163–9.
  149. Machida C, Machida Y. 1989. Regulation of IS1 transposition by the insA gene product. *J Mol Biol* 208:567–74.
  150. Escoubas JM, Prère MF, Fayet O, Salvignol I, Galas D, Zerbib D, Chandler M. 1991. Translational control of transposition activity of the bacterial insertion sequence IS1. *EMBO J* 10:705–12.
  151. Leclercq R, Cantó N R, Brown DFJ, Giske CG, Heisig P, Macgowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy C-J, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G. 2013. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 19:141–160.
  152. López-Camacho E, Rentero Z, Ruiz-Carrascoso G, Wesselink J-J, Pérez-Vázquez M, Lusa-Bernal S, Gómez-Puertas P, Kingsley RA, Gómez-Sánchez P, Campos J, Oteo J, Mingorance J. 2014. Design of clone-specific probes from genome sequences for rapid PCR-typing of outbreak pathogens. *Clin Microbiol Infect* 20:O891-3.
  153. Wood E. 1983. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Biochem Educ* 11:82.
  154. Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10:512–26.

155. Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874.
156. Stoddard SF, Smith BJ, Hein R, Roller BRK, Schmidt TM. 2015. rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res* 43:D593–D598.
157. Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, Jenney A, Follador R, Thomson NR, Holt KE. 2016. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microb Genomics* 2:e000102.
158. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C, Decré D. 2013. wzi Gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. *J Clin Microbiol* 51:4073–8.
159. Felsenstein J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution (N Y)* 39:783.
160. Jiang Y, Wei Z, Wang Y, Hua X, Feng Y, Yu Y. 2015. Tracking a hospital outbreak of KPC-producing ST11 *Klebsiella pneumoniae* with whole genome sequencing. *Clin Microbiol Infect* 21:1001–1007.
161. Mathers AJ, Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, Giess A, Yeh AJ, Didelot X, Turner SD, Sebra R, Kasarskis A, Peto T, Crook D, Sifri CD. 2015. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* at a single institution: insights into endemicity from whole-genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 59:1656–63.
162. Chung The H, Karkey A, Pham Thanh D, Boinett CJ, Cain AK, Ellington M, Baker KS, Dongol S, Thompson C, Harris SR, Jombart T, Le Thi Phuong T, Tran Do Hoang N, Ha Thanh T, Shretha S, Joshi S, Basnyat B, Thwaites G, Thomson NR, Rabaa MA, Baker S. 2015. A high-resolution genomic analysis of multidrug-resistant hospital outbreaks of *Klebsiella pneumoniae*. *EMBO Mol Med* 7:227–239.
163. Haller S, Eller C, Hermes J, Kaase M, Steglich M, Radonić A, Dabrowski PW, Nitsche A, Pfeifer Y, Werner G, Wunderle W, Velasco E, Abu Sin M, Eckmanns T, Nübel U. 2015. What caused the outbreak of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit, Germany 2009 to 2012? Reconstructing transmission with epidemiological analysis and whole-genome sequencing. *BMJ Open* 5:e007397.

164. Moradigaravand D, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. 2017. Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. *MBio* 8:e01976-16.
165. Pérez-Vázquez M, Oteo J, García-Cobos S, Aracil B, Harris SR, Ortega A, Fontanals D, Hernández JM, Solís S, Campos J, Dougan G, Kingsley RA. 2016. Phylogeny, resistome and mobile genetic elements of emergent OXA-48 and OXA-245 *Klebsiella pneumoniae* clones circulating in Spain. *J Antimicrob Chemother* 71:887–96.
166. Kirov G, Pocklington AJ, Holmans P, Ivanov D, Ikeda M, Ruderfer D, Moran J, Chambert K, Toncheva D, Georgieva L, Grozeva D, Fjodorova M, Wollerton R, Rees E, Nikolov I, van de Lagemaat LN, Bayés À, Fernandez E, Olason PI, Böttcher Y, Komiyama NH, Collins MO, Choudhary J, Stefansson K, Stefansson H, Grant SGN, Purcell S, Sklar P, O'Donovan MC, Owen MJ. 2012. De novo CNV analysis implicates specific abnormalities of postsynaptic signalling complexes in the pathogenesis of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 17:142–153.
167. Priebe L, Degenhardt FA, Herms S, Haenisch B, Mattheisen M, Nieratschker V, Weingarten M, Witt S, Breuer R, Paul T, Alblas M, Moebus S, Lathrop M, Leboyer M, Schreiber S, Grigoriou-Serbanescu M, Maier W, Propping P, Rietschel M, Nöthen MM, Cichon S, Mühleisen TW. 2012. Genome-wide survey implicates the influence of copy number variants (CNVs) in the development of early-onset bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 17:421–432.
168. Malhotra D, McCarthy S, Michaelson JJ, Vacic V, Burdick KE, Yoon S, Cichon S, Corvin A, Gary S, Gershon ES, Gill M, Karayiorgou M, Kelsoe JR, Krastoshevsky O, Krause V, Leibenluft E, Levy DL, Makarov V, Bhandari A, Malhotra AK, McMahon FJ, Nöthen MM, Potash JB, Rietschel M, Schulze TG, Sebat J. 2011. High Frequencies of De Novo CNVs in Bipolar Disorder and Schizophrenia. *Neuron* 72:951–963.
169. Chiang DY, Getz G, Jaffe DB, O'Kelly MJT, Zhao X, Carter SL, Russ C, Nusbaum C, Meyerson M, Lander ES. 2009. High-resolution mapping of copy-number alterations with massively parallel sequencing. *Nat Methods* 6:99–103.
170. Miller CA, Hampton O, Coarfa C, Milosavljevic A, Donahoe P. 2011. ReadDepth: A Parallel R Package for Detecting Copy Number Alterations from Short Sequencing Reads. *PLoS One* 6:e16327.

171. Xi R, Hadjipanayis AG, Luquette LJ, Kim T-M, Lee E, Zhang J, Johnson MD, Muzny DM, Wheeler DA, Gibbs RA, Kucherlapati R, Park PJ. 2011. Copy number variation detection in whole-genome sequencing data using the Bayesian information criterion. *Proc Natl Acad Sci* 108:E1128–E1136.
172. Drmanac R, Sparks AB, Callow MJ, Halpern AL, Burns NL, Kermani BG, Carnevali P, Nazarenko I, Nilsen GB, Yeung G, Dahl F, Fernandez A, Staker B, Pant KP, Baccash J, Borcherting AP, Brownley A, Cedeno R, Chen L, Chernikoff D, Cheung A, Chirita R, Curson B, Ebert JC, Hacker CR, Hartlage R, Hauser B, Huang S, Jiang Y, Karpinchyk V, Koenig M, Kong C, Landers T, Le C, Liu J, McBride CE, Morenzoni M, Morey RE, Mutch K, Perazich H, Perry K, Peters BA, Peterson J, Pethiyagoda CL, Pothuraju K, Richter C, Rosenbaum AM, Roy S, Shafto J, Sharanhovich U, Shannon KW, Sheppy CG, Sun M, Thakuria J V., Tran A, Vu D, Zaraneek AW, Wu X, Drmanac S, Oliphant AR, Banyai WC, Martin B, Ballinger DG, Church GM, Reid CA. 2010. Human Genome Sequencing Using Unchained Base Reads on Self-Assembling DNA Nanoarrays. *Science* (80- ) 327:78–81.
173. Yau C. 2013. OncoSNP-SEQ: a statistical approach for the identification of somatic copy number alterations from next-generation sequencing of cancer genomes. *Bioinformatics* 29:2482–2484.
174. Liu B, Morrison CD, Johnson CS, Trump DL, Qin M, Conroy JC, Wang J, Liu S. 2013. Computational methods for detecting copy number variations in cancer genome using next generation sequencing: principles and challenges. *Oncotarget* 4:1868–1881.
175. Thabet S, Souissi N. 2017. Transposition mechanism, molecular characterization and evolution of IS6110, the specific evolutionary marker of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mol Biol Rep* 44:25–34.
176. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31:406–9.
177. Yang ZH, Bates JH, Eisenach KD, Cave MD. 2001. Secondary typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with matching IS6110 fingerprints from different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol* 39:1691–5.
178. Patel S, Wall S, Saunders NA. 1996. Heminested inverse PCR for IS6110 fingerprinting of

- Mycobacterium tuberculosis strains. J Clin Microbiol 34:1686–90.
179. Reyes A, Sandoval A, Cubillos-Ruiz A, Varley KE, Hernández-Neuta I, Samper S, Martín C, García MJ, Ritacco V, López L, Robledo J, Zambrano MM, Mitra RD, Del Portillo P. 2012. IS-seq: a novel high throughput survey of in vivo IS6110 transposition in multiple Mycobacterium tuberculosis genomes. BMC Genomics 13:249.
  180. Gudnason H, Dufva M, Bang DD, Wolff A. 2007. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. Nucleic Acids Res 35:e127.
  181. Garvin AM, Holzgreve W, Hahn S. 1998. Highly accurate analysis of heterozygous loci by single cell PCR. Nucleic Acids Res 26:3468–72.
  182. Gudnason H, Dufva M, Bang DD, Wolff A. 2007. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. Nucleic Acids Res 35:e127.
  183. Metzker ML. 2010. Sequencing technologies — the next generation. Nat Rev Genet 11:31–46.

Apartado de Material Suplementario:

184. Swayne RL, Ludlam HA, Shet VG, Woodford N, Curran MD. 2011. Real-time TaqMan PCR for rapid detection of genes encoding five types of non-metallo- (class A and D) carbapenemases in Enterobacteriaceae. Int J Antimicrob Agents 38:35–8.

# Material suplementario



**Anexo 1:** Tabla de Cebadores y sondas y condiciones de la PCR utilizados para la detección de carbapenemasa tipo OXA-48 (184).

Nombre	Secuencia 5'-3'	
Oxa-48qF	TTCGGCCACGGAGCAAATCAG	
Oxa-48qR	GATGTGGGCATATCCATATTCATCGCA	
Oxa-48P	6FAM-CTGGCTGCGCTCCGATACGTGTAACCTATTG-BHQ1	
Reactivos	Concentración final	
Oxa-48qF (10µM)	0.5 µM	
Oxa-48qR (10µM)	0.5 µM	
Oxa-48P (10µM)	0.2 µM	
Premix Ex Taq™ Perfect Real Time (Takara Bio Inc.)	1x	
ROX Reference Dye (Takara Bio Inc.)	1x	
Desnaturalización inicial	Amplificación	Ciclos
95°C 5min	95°C 15s	x40
	60°C 1min*	*Adquisición de la fluorescencia

**Anexo 2:** Secuencias que se usaron para extraer informáticamente las lecturas que contenían las secuencias de los extremos de los ISs.

Nombre	Secuencia 5'-3'
<b>ISKpn14-F</b>	GGTGATGCTGCCAACTTACTGATTT
<b>ISKpn1-F</b>	TGGACTGCACCCCAAAAGTTGGACA
<b>IS26-F</b>	GGCACTGTTGCAAATAGTCGGTGGT
<b>ISEcp1-F</b>	CCTAGATTCTACGTCAGTACTTCAA
<b>IS1-R</b>	AAATCAGTAAGTTGGCAGCATCACC
<b>ISKpn1-R</b>	TGTCCAACCTTTTGGGGTGCAGTCCA
<b>IS26-R</b>	ACCACCGACTATTTGCAACAGTGCC
<b>ISKpn14-R</b>	TTGAAGTACTGACGTAGAATCTAGG

**Anexo 3:** Tabla de SNPs encontrados en las 96 cepas frente a la referencia Kp2. Se indica la posición del SNP en el *pseudocromosoma* de Kp2, el tipo de mutación, la mutación, el gen y el cambio de aminoácido.

SNP	Posición	Tipo	Mutación	Gen	Mut aa
1	2.428	(transition)	C -> T	Cystine ABC transporter. ATP-binding protein CDS	V -> M
2	7.260	(transversion)	A -> C		
3	13.901	(transversion)	A -> C	DNA-cytosine methyltransferase (EC 2.1.1.37) CDS	
4	14.538	(transversion)	A -> T	DNA-cytosine methyltransferase (EC 2.1.1.37) CDS	L -> Q
5	21.359	(transition)	A -> G	L.D-transpeptidase ErkC CDS	
6	25.451	(transition)	A -> G	Mobile element protein CDS	
7	55.861	(transversion)	A -> C	FIG00639976: hypothetical protein CDS	T -> P
8	73.097	(transversion)	G -> T	TriL protein CDS	A -> S
9	76.632	(transversion)	T -> G	FIG00925693: hypothetical protein CDS	E -> D
10	103.119	(transition)	C -> T	Shikimate transporter CDS	
11	110.460	(transversion)	G -> T	Putative inner membrane protein CDS	S -> Y
12	130.809	(transversion)	G -> T	Putative glycosyl transferase CDS	
13	136.919	(transition)	G -> A		
14	151.419	(transversion)	A -> T	Colanic acid biosynthesis UDP-glucose lipid carrier transferase WcaJ CDS	F -> Y
15	154.700	(transition)	C -> T	FIG01055667: hypothetical protein CDS	D -> N

16	158.279	(transition)	T -> C	Tyrosine-protein kinase Wzc (EC 2.7.10.2) CDS	E -> G
17	163.873	(transition)	G -> A		
18	194.256	(transition)	G -> A	Ribitol/Xylitol/Arabitol transporter. MFS superfamily CDS	T -> I
19	201.034	(transition)	G -> A	Ribitol 2-dehydrogenase (EC 1.1.1.56) CDS	
20	214.577	(transversion)	G -> T	Scaffold protein for [4Fe-4S] cluster assembly ApbC. MRP-like CDS	
21	217.647	(transversion)	C -> A	Two-component response-regulatory protein YehT CDS	A -> S
22	219.008	(transition)	G -> A	Autolysis histidine kinase LytS CDS	L -> F
23	239.865	(transversion)	G -> T	Porin B precursor CDS	A -> E
24	244.678	(transition)	C -> T		
25	250.708	(transversion)	A -> T	FIG00924762: possible membrane protein CDS	I -> N
26	268.570	(transition)	G -> A	D-mannanate oxidoreductase (EC 1.1.1.57) CDS	
27	276.626	(transversion)	C -> G	Oligopeptide transport system permease protein OppB (TC 3.A.1.5.1) CDS	
28	283.179	(transition)	G -> A	ATP-dependent RNA helicase YejH CDS	E -> K
29	291.433	(transition)	C -> T	FIG001881: hydrolase of alkaline phosphatase superfamily CDS	R -> C
30	306.408	(transversion)	T -> A	Malate:quinone oxidoreductase (EC 1.1.5.4) CDS	Q -> L
31	315.395	(transition)	C -> T	Outer membrane protein C precursor CDS	D -> N
32	315.504	(transversion)	G -> T	Outer membrane protein C precursor CDS	
33	315.699	(transversion)	C -> A	Outer membrane protein C precursor CDS	
34	315.997	(transition)	T -> C	Outer membrane protein C precursor CDS	D -> G
35	316.156	(transition)	T -> C	Outer membrane protein C precursor CDS	Q -> R
36	316.262	(transition)	C -> T	Outer membrane protein C precursor CDS	D -> N
37	316.376	(transition)	G -> A	Outer membrane protein C precursor CDS	
38	317.561	(transition)	G -> A	Two-component sensor protein RcsD (EC 2.7.3.-) CDS	
39	320.663	(transition)	C -> T	Two-component sensor protein RcsC (EC 2.7.3.-) CDS	E -> K
40	335.415	(transversion)	A -> C	Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit A (EC 1.1.5.3) CDS	T -> P
41	335.553	(transition)	T -> C	Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit A (EC 1.1.5.3) CDS	F -> L
42	361.263	(transition)	G -> A	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain I (EC 1.6.5.3) CDS	R -> C
43	367.724	(transition)	G -> A	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain C (EC 1.6.5.3) / NADH-ubiquinone oxidoreductase chain D (EC 1.6.5.3) CDS	
44	392.588	(transversion)	C -> A	Amidophosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.14) CDS	D -> Y
45	393.990	(transversion)	T -> A		
46	394.345	(transversion)	C -> G	DedD protein CDS	
47	397.731	(transversion)	A -> C	DedA protein CDS	S -> A
48	400.557	(transition)	G -> A	Erythronate-4-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.290) CDS	A -> V
49	400.810	(transition)	A -> G	Erythronate-4-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.290) CDS	
50	405.514	(transition)	G -> A	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferase (EC 2.1.1.61) CDS	G -> S



51	432.806	(transition)	T -> C	Pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1); Alpha-keto-acid decarboxylase (EC 4.1.1.-) CDS	I -> V
52	440.957	(transition)	T -> C		
53	449.904	(transversion)	T -> A	hypothetical protein CDS	
54	463.652	(transition)	G -> A	Predicted dye-decolorizing peroxidase (DyP). YfeX-like subgroup CDS	P -> S
55	483.952	(transition)	G -> A	NADP-dependent malic enzyme (EC 1.1.1.40) CDS	A -> V
56	508.621	(transition)	A -> G	Exported zinc metalloprotease YfgC precursor CDS	E -> G
57	564.508	(transition)	G -> A	Inositol-1-monophosphatase (EC 3.1.3.25) CDS	E -> K
58	593.355	(transition)	G -> A	Pyridoxine 5'-phosphate synthase (EC 2.6.99.2) CDS	
59	600.629	(transition)	C -> T	Sigma factor RpoE negative regulatory protein RseB precursor CDS	R -> H
60	608.575	(transition)	A -> G	hypothetical tRNA/rRNA methyltransferase yfiF [EC:2.1.1.-] CDS	V -> A
61	644.304	(transition)	C -> T	Ribosomal-protein-serine acetyltransferase (EC 2.3.1.-) CDS	E -> K
62	645.556	(transition)	T -> C	Transcriptional regulator. TetR family CDS	F -> L
63	647.022	(transversion)	C -> A		
64	694.350	(transversion)	G -> T	Hydroxymethylpyrimidine ABC transporter. transmembrane component CDS	A -> S
65	697.884	(transition)	C -> T	L-2,4-diaminobutyrate decarboxylase (EC 4.1.1.86) CDS	H -> Y
66	699.526	(transversion)	A -> T	Transcriptional regulator CDS	
67	733.262	(transition)	C -> T	Putative formate dehydrogenase oxidoreductase protein CDS	
68	744.819	(transition)	C -> T	Protein yciE CDS	
69	752.095	(transversion)	A -> C	putative glycosyltransferase CDS	T -> P
70	756.683	(transversion)	T -> A	Inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) CDS	
71	759.159	(transversion)	A -> T	ABC-type dipeptide transport system. periplasmic component CDS	N -> I
72	759.455	(transition)	A -> G	ABC-type dipeptide transport system. periplasmic component CDS	T -> A
73	761.586	(transition)	T -> C	Dipeptide transport system permease protein DppC (TC 3.A.1.5.2) CDS	I -> T
74	768.279	(transition)	C -> T	FIG00732265: hypothetical protein CDS	
75	773.971	(transversion)	A -> T		
76	779.785	(transition)	C -> T	Muconolactone isomerase (EC 5.3.3.4) CDS	
77	783.725	(transition)	A -> G		
78	783.739	(transition)	G -> A		
79	810.602	(transversion)	C -> A	Nitrilotriacetate monooxygenase component A (EC 1.14.13.-) CDS	S -> I
80	819.974	(transversion)	A -> C	Probable tonB-dependent receptor yncD precursor CDS	T -> P
81	833.399	(transversion)	A -> C		
82	834.515	(transition)	G -> A	4-aminobutyraldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.19) CDS	P -> S
83	838.581	(transition)	G -> A	ABC transporter. periplasmic spermidine putrescine-binding protein PotD (TC 3.A.1.11.1) CDS	
84	864.347	(transition)	A -> G	Quinate/shikimate dehydrogenase [Pyrroloquinoline-quinone] (EC 1.1.99.25) CDS	N -> S
85	883.865	(transversion)	C -> A	Di/tripeptide permease DtpA CDS	A -> E
86	886.016	(transition)	C -> T	Pyridoxal kinase (EC 2.7.1.35) CDS	G -> S
87	899.361	(transversion)	A -> T	N-ethylmaleimide reductase (EC 1.-.-.-) CDS	
88	899.748	(transversion)	G -> C	N-ethylmaleimide reductase (EC 1.-.-.-) CDS	V -> L

89	901.917	(transversion)	A -> T		
90	913.821	(transition)	T -> C	Acid shock protein precursor CDS	V -> A
91	913.824	(transversion)	C -> A	Acid shock protein precursor CDS	A -> E
92	913.840	(transversion)	T -> G	Acid shock protein precursor CDS	
93	913.843	(transition)	A -> G	Acid shock protein precursor CDS	
94	920.787	(transition)	G -> A		
95	930.477	(transversion)	G -> T	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppF (TC 3.A.1.5.1) CDS	D -> Y
96	931.834	(transition)	A -> G	FIG00732114: hypothetical protein CDS	D -> G
97	932.878	(transversion)	A -> C	Permeases of the major facilitator superfamily CDS	V -> G
98	963.879	(transversion)	T -> A	2,3-butanediol dehydrogenase. S-alcohol forming. (R)-acetoin-specific (EC 1.1.1.4) / Acetoin (diacetyl) reductase (EC 1.1.1.304) CDS	S -> T
99	965.779	(transition)	G -> A	Undecaprenyl-phosphate N-acetylglucosaminyl 1-phosphate transferase (EC 2.7.8.-) CDS	H -> Y
100	984.105	(transition)	G -> A	ABC transporter involved in cytochrome c biogenesis. CcmB subunit CDS	A -> V
101	994.161	(transversion)	C -> A		
102	1.000.425	(transition)	G -> A	Transporter. MFS superfamily CDS	G -> D
103	1.017.842	(transition)	G -> A	ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport systems. periplasmic components CDS	A -> V
104	1.021.200	(transversion)	T -> A	Transcriptional regulator. LysR family CDS	Q -> L
105	1.022.390	(transition)	G -> A	Rhodanese-related sulfurtransferase CDS	A -> T
106	1.025.934	(transition)	G -> A	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase (EC 4.1.3.39) CDS	A -> V
107	1.031.537	(transition)	C -> T	3-(3-hydroxy-phenyl)propionate hydroxylase (EC 1.14.13.-) CDS	V -> I
108	1.046.269	(transition)	C -> T	Cysteine desulfurase (EC 2.8.1.7). SufS subfamily CDS	G -> D
109	1.049.639	(transversion)	G -> C	Iron-sulfur cluster assembly protein SufB CDS	S -> W
110	1.083.098	(transition)	A -> G	Transcriptional regulator. LacI family CDS	L -> S
111	1.083.630	(transition)	A -> G	Hexuronate transporter CDS	S -> G
112	1.084.365	(transition)	A -> G	Hexuronate transporter CDS	T -> A
113	1.087.164	(transition)	G -> A	Alpha-glucosidase (EC 3.2.1.20) CDS	A -> T
114	1.102.109	(transition)	C -> T	Glutamate transport membrane-spanning protein CDS	R -> C
115	1.108.473	(transition)	C -> T	Anthranilate phosphoribosyltransferase like (EC 2.4.2.18) CDS	E -> K
116	1.113.780	(transition)	C -> T	Transketolase. C-terminal section (EC 2.2.1.1) CDS	G -> D
117	1.122.905	(transversion)	G -> C	ABC transport system. permease component YbhS CDS	A -> P
118	1.131.370	(transversion)	A -> T	Molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaA CDS	
119	1.132.557	(transversion)	A -> T	FIG002813: LPPG:FO 2-phospho-L-lactate transferase like. CofD-like CDS	E -> D
120	1.149.649	(transversion)	A -> T	Histidine ammonia-lyase (EC 4.3.1.3) CDS	I -> N
121	1.164.777	(transition)	G -> A	Putative phosphatase CDS	M -> I
122	1.176.433	(transition)	G -> A	2-keto-3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase I alpha (EC 2.5.1.54) CDS	
123	1.202.338	(transversion)	C -> A		
124	1.210.558	(transition)	A -> G		
125	1.232.938	(transition)	G -> A	PTS system. N-acetylglucosamine-specific IIA component (EC 2.7.1.69) /	R -> C

				PTS system. N-acetylglucosamine-specific IIB component (EC 2.7.1.69) / PTS system. N-acetylglucosamine-specific IIC component (EC 2.7.1.69) CDS	
126	1.234.357	(transition)	A -> G		
127	1.235.491	(transversion)	T -> A	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (EC 3.5.1.25) CDS	I -> N
128	1.244.335	(transversion)	C -> A	tRNA-i(6)A37 methylthiotransferase CDS	
129	1.265.238	(transition)	G -> A	Penicillin-binding protein 2 (PBP-2) CDS	V -> M
130	1.288.941	(transversion)	G -> T	Anaerobic dimethyl sulfoxide reductase chain A (EC 1.8.5.3) CDS	Q -> K
131	1.296.952	(transversion)	A -> C	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95) CDS	V -> G
132	1.301.699	(transition)	A -> G	FIG000557: hypothetical protein co-occurring with RecR CDS	S -> G
133	1.322.340	(transition)	G -> A	Proofreading thioesterase in enterobactin biosynthesis EntH CDS	
134	1.337.872	(transition)	T -> C		
135	1.338.050	(transversion)	C -> G		
136	1.341.089	(transition)	C -> T	Transketolase. C-terminal section (EC 2.2.1.1) CDS	R -> H
137	1.341.626	(transition)	G -> A	Transketolase. C-terminal section (EC 2.2.1.1) CDS	P -> L
138	1.351.681	(transition)	G -> A	Short chain dehydrogenase CDS	V -> I
139	1.353.891	(transition)	G -> A	Glycine cleavage system transcriptional activator GcvA CDS	V -> I
140	1.359.919	(transversion)	T -> A	Betaine aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.8) CDS	F -> I
141	1.361.822	(transition)	G -> A	Choline dehydrogenase (EC 1.1.99.1) CDS	A -> T
142	1.373.767	(transition)	G -> A	extracellular solute-binding protein. family 3 CDS	T -> I
143	1.380.465	(transversion)	T -> A		
144	1.404.547	(transition)	G -> A	Putative outer membrane protein CDS	
145	1.410.158	(transversion)	T -> A	FIG000875: Thioredoxin domain-containing protein EC-YbbN CDS	
146	1.420.193	(transition)	G -> A	UDP-sugar hydrolase (EC 3.6.1.45); 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) CDS	A -> V
147	1.420.276	(transition)	C -> T	UDP-sugar hydrolase (EC 3.6.1.45); 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) CDS	
148	1.420.660	(transition)	T -> C		
149	1.437.956	(transition)	C -> T	Potassium efflux system KefA protein / Small-conductance mechanosensitive channel CDS	G -> E
150	1.438.585	(transition)	C -> T	Transcription repressor of multidrug efflux pump acrAB operon. TetR (AcrR) family CDS	
151	1.438.618	(transition)	C -> T	Transcription repressor of multidrug efflux pump acrAB operon. TetR (AcrR) family CDS	M -> I
152	1.442.873	(transition)	G -> A	RND efflux system. inner membrane transporter CmeB CDS	
153	1.443.102	(transition)	T -> C	RND efflux system. inner membrane transporter CmeB CDS	Y -> H
154	1.445.002	(transition)	C -> T	Maltose O-acetyltransferase (EC 2.3.1.79) CDS	A -> V
155	1.449.540	(transition)	G -> A	Transcriptional repressor of the lac operon CDS	
156	1.453.673	(transition)	G -> A	Beta-galactosidase (EC 3.2.1.23) CDS	
157	1.464.579	(transition)	G -> A	Transcriptional regulator. GntR family domain / Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1) CDS	A -> T
158	1.483.359	(transversion)	C -> A		
159	1.495.038	(transition)	G -> A	Cytochrome O ubiquinol oxidase subunit I (EC 1.10.3.-) CDS	G -> S

160	1.507.068	(transversion)	C -> A	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases CDS	
161	1.512.651	(transition)	C -> T	tRNA S(4)U 4-thiouridine synthase (former ThiI) / Rhodanese-like domain required for thiamine synthesis CDS	M -> I
162	1.522.599	(transition)	T -> C	Hypothetical lipoprotein yajI CDS	V -> A
163	1.565.339	(transition)	G -> A	Putative inner membrane protein CDS	
164	1.566.317	(transition)	T -> C	Putative outer membrane lipoprotein CDS	E -> G
165	1.569.538	(transversion)	T -> G	Penicillin-binding protein AmpH CDS	V -> G
166	1.570.066	(transversion)	A -> C	Penicillin-binding protein AmpH CDS	D -> A
167	1.574.809	(transition)	A -> G	Taurine transport system permease protein TauC CDS	L -> P
168	1.578.193	(transition)	G -> A	Homocysteine S-methyltransferase (EC 2.1.1.10) CDS	
169	1.594.450	(transversion)	T -> A	CFA/I fimbrial minor adhesin CDS	D -> V
170	1.608.238	(transition)	A -> G	Outer membrane pore protein E precursor CDS	
171	1.622.730	(transition)	C -> T	FIG00731676: hypothetical protein CDS	
172	1.629.094	(transition)	A -> G	Dihydrolipoamide dehydrogenase of pyruvate dehydrogenase complex (EC 1.8.1.4) CDS	Y -> C
173	1.630.583	(transition)	G -> A		
174	1.640.810	(transition)	A -> G	Carbon starvation induced protein CsiD CDS	T -> A
175	1.691.796	(transversion)	G -> T	VgrG protein CDS	E -> D
176	1.695.976	(transition)	T -> C	hypothetical protein CDS	I -> T
177	1.700.605	(transition)	T -> C	hypothetical protein CDS	Y -> H
178	1.700.712	(transition)	A -> G	hypothetical protein CDS	
179	1.703.099	(transversion)	C -> A	probable membrane protein YPO1482 CDS	L -> I
180	1.705.152	(transversion)	G -> T	Uncharacterized protein ImpA CDS	Q -> H
181	1.710.569	(transition)	G -> A	Uncharacterized oxidoreductase Yjgl (EC 1.-.-.-) CDS	
182	1.758.669	(transversion)	C -> A		
183	1.769.561	(transversion)	C -> A	FMN-dependent NADH-azoreductase CDS	G -> V
184	1.770.069	(transversion)	G -> T		
185	1.788.047	(transversion)	T -> A	Succinylarginine dihydrolase (EC 3.5.3.23) CDS	L -> Q
186	1.796.608	(transition)	C -> T		
187	1.797.742	(transversion)	C -> G	Putative transport system permease protein CDS	V -> L
188	1.800.465	(transition)	A -> G		
189	1.807.735	(transition)	C -> T	Mannose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.8) CDS	E -> K
190	1.811.811	(transversion)	T -> G	Fumarate hydratase class II (EC 4.2.1.2) CDS	F -> C
191	1.819.159	(transversion)	G -> T	Protein ydgH precursor CDS	
192	1.827.180	(transition)	T -> C	Aminobenzoyl-glutamate transport protein CDS	N -> S
193	1.827.322	(transversion)	G -> T	Aminobenzoyl-glutamate transport protein CDS	L -> M
194	1.828.704	(transition)	C -> T	Catalyzes the cleavage of p-aminobenzoyl-glutamate to p-aminobenzoate and glutamate. subunit B CDS	A -> T
195	1.853.745	(transversion)	T -> A	Glucokinase regulatory protein CDS	
196	1.879.735	(transition)	G -> A	Anaerobic dimethyl sulfoxide reductase chain A (EC 1.8.99.-) CDS	
197	1.880.991	(transition)	G -> A		
198	1.891.444	(transition)	C -> T		
199	1.897.567	(transition)	A -> G	Diguanylate cyclase/phosphodiesterase domain 2 (EAL) CDS	
200	1.899.457	(transversion)	C -> A	Right origin-binding protein CDS	
201	1.903.757	(transition)	T -> C	FIG00641944: hypothetical protein CDS	D -> G

202	1.909.645	(transition)	C -> T	Lactose permease CDS	R -> H
203	1.914.508	(transition)	A -> G	hypothetical protein CDS	M -> T
204	1.924.845	(transversion)	T -> A	Putative transport protein CDS	Y -> F
205	1.927.755	(transversion)	T -> G	Multiple antibiotic resistance protein MarR CDS	D -> A
206	1.928.227	(transversion)	G -> T	Multiple antibiotic resistance protein MarC CDS	L -> F
207	1.946.533	(transition)	C -> T	FIG00731729: hypothetical protein CDS	
208	1.965.768	(transition)	A -> G	Transcription regulatory protein opdE CDS	T -> A
209	2.008.638	(transition)	A -> G		
210	2.008.721	(transition)	A -> G		
211	2.013.971	(transition)	A -> G	Deoxyribose-phosphate aldolase (EC 4.1.2.4) CDS	H -> R
212	2.029.759	(transversion)	C -> A	Phosphoglycerate transport system transcriptional regulatory protein PgtA CDS	
213	2.033.965	(transversion)	G -> T	Phosphoglycerate transport regulatory protein PgtC CDS	
214	2.056.052	(transition)	A -> G	putative secretion protein CDS	T -> A
215	2.060.648	(transition)	C -> T	FIG00731709: hypothetical protein CDS	G -> S
216	2.072.033	(transversion)	A -> T	ascBF operon repressor CDS	K -> M
217	2.078.191	(transition)	G -> A	2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase (EC 4.1.2.-) CDS	
218	2.095.718	(transition)	C -> T	D-galactonate transporter CDS	V -> M
219	2.097.327	(transversion)	C -> A	Sorbitol dehydrogenase (EC 1.1.1.14) CDS	L -> I
220	2.102.923	(transition)	G -> A	PTS system, mannose-specific IIA component (EC 2.7.1.69) CDS	E -> K
221	2.117.826	(transition)	C -> T	Transcriptional activator protein bglJ CDS	A -> V
222	2.136.440	(transversion)	G -> T	Purine nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1) CDS	M -> I
223	2.165.181	(transversion)	A -> T	L-Proline/Glycine betaine transporter ProP CDS	D -> V
224	2.177.015	(transition)	C -> T	Isoleucyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.5) CDS	R -> C
225	2.184.701	(transition)	C -> T	Sensor kinase CitA, DpiB (EC 2.7.3.-) CDS	E -> K
226	2.201.686	(transition)	G -> A	Carbamoyl-phosphate synthase large chain (EC 6.3.5.5) CDS	R -> H
227	2.215.453	(transition)	G -> A	Sensor kinase CitA, DpiB (EC 2.7.3.-) CDS	
228	2.222.078	(transversion)	T -> G		
229	2.224.120	(transition)	T -> C	DNA polymerase II (EC 2.7.7.7) CDS	D -> G
230	2.244.784	(transition)	G -> A	2,4-dienoyl-CoA reductase [NADPH] (EC 1.3.1.34) CDS	
231	2.255.373	(transition)	C -> T	Fructose repressor FruR, LacI family CDS	A -> V
232	2.259.035	(transition)	C -> T	Cell division protein FtsI [Peptidoglycan synthetase] (EC 2.4.1.129) CDS	P -> L
233	2.285.047	(transition)	T -> C	Quinolinate phosphoribosyltransferase [decarboxylating] (EC 2.4.2.19) CDS	T -> A
234	2.309.138	(transition)	T -> C	BarA-associated response regulator UvrY (= GacA = SirA) CDS	I -> T
235	2.322.832	(transversion)	C -> A	L-arabinose-binding periplasmic protein precursor AraF (TC 3.A.1.2.2) CDS	A -> D
236	2.331.370	(transition)	C -> T	Rhamnogalacturonides degradation protein RhiN CDS	
237	2.344.866	(transition)	G -> A	Zinc ABC transporter, inner membrane permease protein ZnuB CDS	
238	2.345.011	(transition)	A -> G	Zinc ABC transporter, inner membrane permease protein ZnuB CDS	I -> T
239	2.349.432	(transition)	C -> T	Lipid A biosynthesis (KDO) 2-(lauroyl)-lipid IVA acyltransferase (EC 2.3.1.-) CDS	P -> L

240	2.372.126	(transition)	C -> T	FIG00731406: hypothetical protein CDS	E -> K
241	2.391.448	(transversion)	C -> A	PTS system. mannose-specific IID component CDS	D -> Y
242	2.404.389	(transition)	G -> A	TsaB protein. required for threonylcarbamoyladenosine (t(6)A) formation in tRNA CDS	A -> T
243	2.407.762	(transition)	T -> C	Ribonuclease D (EC 3.1.26.3) CDS	L -> P
244	2.451.243	(transversion)	T -> G		
245	2.454.834	(transition)	T -> C		
246	2.458.085	(transversion)	C -> A	Putative cold-shock protein CDS	K -> N
247	2.476.720	(transition)	A -> G	serine/threonine kinase CDS	
248	2.477.893	(transition)	C -> T	serine/threonine kinase CDS	P -> S
249	2.486.154	(transition)	C -> T	Protein ImpG/VasA CDS	
250	2.491.443	(transition)	G -> A	Ribose ABC transport system. periplasmic ribose-binding protein RbsB (TC 3.A.1.2.1) CDS	A -> T
251	2.496.004	(transition)	G -> A	Putative sulfate permease CDS	P -> S
252	2.506.627	(transition)	T -> C	Calcium/proton antiporter CDS	T -> A
253	2.511.286	(transition)	G -> A	Nitrate ABC transporter. nitrate-binding protein CDS	G -> S
254	2.522.268	(transition)	G -> A	Nitrate/nitrite response regulator protein CDS	P -> L
255	2.534.442	(transition)	C -> T	Leucine-responsive regulatory protein. regulator for leucine (or lrp) regulon and high-affinity branched-chain amino acid transport system CDS	P -> S
256	2.554.373	(transition)	G -> A	Cardiolipin synthetase (EC 2.7.8.-) CDS	A -> V
257	2.583.203	(transition)	T -> C	Phosphoenolpyruvate synthase (EC 2.7.9.2) CDS	L -> P
258	2.591.986	(transversion)	T -> A	FIG00919961: hypothetical protein CDS	
259	2.594.369	(transition)	A -> G	Transporter. MFS superfamily CDS	S -> P
260	2.622.867	(transition)	A -> G	Cellulose synthase operon protein C CDS	D -> G
261	2.647.383	(transition)	G -> A	2-dehydro-3-deoxygluconate kinase (EC 2.7.1.45) CDS	
262	2.678.366	(transition)	G -> A	Nickel ABC transporter. periplasmic nickel-binding protein Nika (TC 3.A.1.5.3) CDS	A -> V
263	2.679.632	(transversion)	T -> A	Transcriptional regulator. LysR family CDS	K -> M
264	2.691.834	(transition)	G -> A		
265	2.727.774	(transversion)	T -> G	Low-affinity gluconate/H <sup>+</sup> symporter GntU CDS	I -> S
266	2.734.128	(transversion)	C -> A	Glucose-1-phosphate adenyltransferase (EC 2.7.7.27) CDS	F -> L
267	2.734.154	(transversion)	A -> T	Glucose-1-phosphate adenyltransferase (EC 2.7.7.27) CDS	D -> V
268	2.746.836	(transition)	C -> T		
269	2.787.657	(transition)	C -> T	Nitrite reductase [NAD(P)H] large subunit (EC 1.7.1.4) CDS	
270	2.796.957	(transversion)	T -> G	FIG00731345: hypothetical protein CDS	Y -> S
271	2.819.683	(transversion)	A -> T	DNA-directed RNA polymerase beta subunit (EC 2.7.7.6) CDS	D -> V
272	2.839.731	(transition)	C -> T	FIG01200173: hypothetical protein CDS	
273	2.849.025	(transition)	T -> C		
274	2.856.065	(transition)	C -> T	Anaerobic dimethyl sulfoxide reductase chain A (EC 1.8.5.3) CDS	T -> I
275	2.856.238	(transition)	C -> T	Anaerobic dimethyl sulfoxide reductase chain A (EC 1.8.5.3) CDS	
276	2.864.977	(transversion)	G -> T	Formate efflux transporter (TC 2.A.44 family) CDS	A -> D
277	2.876.093	(transversion)	A -> T	DNA internalization-related competence protein ComEC/Rec2 CDS	Q -> L
278	2.884.447	(transition)	G -> A	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase Functionally Coupled to the MukBEF Chromosome Partitioning Mechanism CDS	

279	2.890.668	(transition)	C -> T	Chromosome partition protein MukB CDS	
280	2.896.556	(transversion)	A -> T	Outer membrane protein F precursor CDS	S -> T
281	2.915.362	(transversion)	T -> A	FIG01199806: hypothetical protein CDS	H -> Q
282	2.918.429	(transition)	A -> G	23S rRNA (guanine-N-2-) - methyltransferase rlmL EC 2.1.1.-) CDS	N -> S
283	2.920.399	(transition)	A -> G	COG0488: ATPase components of ABC transporters with duplicated ATPase domains CDS	S -> G
284	2.930.685	(transition)	T -> C	DNA transformation protein TfoX CDS	V -> A
285	2.947.714	(transition)	G -> A	Benzoate 1,2-dioxygenase (EC 1.14.12.10) CDS	S -> F
286	2.950.912	(transition)	G -> A	Tartrate dehydrogenase (EC 1.1.1.93) / Tartrate decarboxylase (EC 4.1.1.73) / D-malic enzyme (EC 1.1.1.83) CDS	P -> L
287	2.957.093	(transversion)	G -> T		
288	2.958.171	(transition)	A -> G	Gamma-glutamyl-putrescine synthetase (EC 6.3.1.11) CDS	N -> S
289	2.983.255	(transversion)	C -> A	Ferrous iron transport periplasmic protein EfeO. contains peptidase-M75 domain and (frequently) cupredoxin-like domain CDS	Q -> K
290	2.993.913	(transition)	C -> T	Putative oxidoreductase component of anaerobic dehydrogenases; Functional role page for Chaperone protein TorD CDS	A -> V
291	3.004.587	(transversion)	A -> T	hypothetical protein CDS	L -> F
292	3.006.177	(transition)	T -> C	N-methyl-L-amino-acid oxidase (EC 1.5.3.2); N-methyl-L-tryptophan oxidase (EC 1.5.3.-) CDS	T -> A
293	3.016.163	(transition)	C -> T	MFS permease protein CDS	
294	3.024.896	(transition)	A -> G	Phosphate:acyl-ACP acyltransferase PlsX CDS	
295	3.067.191	(transversion)	T -> A	Sensor protein PhoQ (EC 2.7.13.3) CDS	N -> Y
296	3.067.363	(transition)	A -> G	Sensor protein PhoQ (EC 2.7.13.3) CDS	
297	3.068.200	(transition)	G -> A	Transcriptional regulatory protein PhoP CDS	S -> L
298	3.074.294	(transversion)	G -> T	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase E (EC 4.2.1.70) CDS	L -> M
299	3.077.446	(transversion)	G -> T	Antibiotic biosynthesis monooxygenase CDS	Q -> K
300	3.078.896	(transition)	A -> G	Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.1) CDS	V -> A
301	3.089.369	(transition)	C -> T	3-polyprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase (EC 4.1.1.-) CDS	V -> M
302	3.100.336	(transition)	C -> T	Purine nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1) CDS	
303	3.106.859	(transversion)	T -> G		
304	3.106.861	(transversion)	T -> A		
305	3.106.930	(transition)	G -> A		
306	3.113.736	(transition)	A -> G	DNA primase (EC 2.7.7.-) CDS	T -> A
307	3.120.922	(transition)	T -> C	Hybrid sensory histidine kinase in two-component regulatory system with EvgA CDS	L -> P
308	3.124.419	(transition)	C -> T	Glycerol uptake facilitator protein CDS	G -> D
309	3.132.418	(transversion)	G -> T	ATP:Cob(I)alamin adenosyltransferase (EC 2.5.1.17) CDS	A -> S
310	3.166.638	(transition)	C -> T	Hexuronate transporter CDS	A -> V
311	3.185.999	(transversion)	G -> T		
312	3.225.140	(transition)	C -> T	FIG00732169: hypothetical protein CDS	
313	3.243.012	(transversion)	C -> G	Uncharacterized ABC transporter. permease component YrbE CDS	W -> C
314	3.252.780	(transition)	A -> G	Monofunctional biosynthetic peptidoglycan transglycosylase (EC 2.4.2.-) CDS	
315	3.254.905	(transversion)	A -> T	Aerobic respiration control sensor	S -> T



				protein arcB (EC 2.7.3.-) CDS	
316	3.255.541	(transversion)	C -> A	Aerobic respiration control sensor protein arcB (EC 2.7.3.-) CDS	G -> W
317	3.275.068	(transversion)	A -> T	Outer membrane stress sensor protease DegS CDS	Q -> L
318	3.275.496	(transition)	G -> A	Outer membrane stress sensor protease DegS CDS	G -> S
319	3.276.488	(transversion)	T -> A	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) CDS	K -> I
320	3.280.738	(transition)	G -> A	FUSARIC ACID RESISTANCE PROTEIN FUSB / FUSARIC ACID RESISTANCE PROTEIN FUSC CDS	T -> I
321	3.287.818	(transition)	G -> A	FIG005080: Possible exported protein CDS	R -> W
322	3.294.178	(transition)	G -> A	RNase E specificity factor CsrD CDS	R -> C
323	3.303.149	(transition)	T -> C		
324	3.305.658	(transition)	T -> C	Phage terminase. large subunit CDS	
325	3.318.603	(transition)	G -> A	hypothetical protein CDS	A -> V
326	3.337.418	(transition)	C -> T	Sucrose-6-phosphate hydrolase (EC 3.2.1.B3) CDS	
327	3.340.544	(transversion)	C -> A		
328	3.355.400	(transition)	G -> A	Arylsulfatase (EC 3.1.6.1) CDS	
329	3.355.538	(transition)	A -> G	Arylsulfatase (EC 3.1.6.1) CDS	
330	3.364.070	(transition)	C -> T	FIG00553873: hypothetical protein CDS	E -> K
331	3.374.965	(transversion)	A -> T	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases CDS	D -> V
332	3.400.920	(transition)	G -> A	Transcriptional regulator. TetR family CDS	
333	3.401.420	(transition)	T -> C		
334	3.401.588	(transition)	C -> T	Outer membrane protein romA CDS	
335	3.401.707	(transition)	G -> A	Outer membrane protein romA CDS	
336	3.402.563	(transition)	C -> T	Outer membrane protein romA CDS	R -> W
337	3.404.912	(transversion)	C -> A	Putative cation-transporting P-type ATPase CDS	R -> S
338	3.427.691	(transition)	C -> T	Metal-dependent hydrolase involved in phosphonate metabolism CDS	
339	3.446.303	(transition)	C -> T		
340	3.466.043	(transition)	C -> T	binding-protein-dependent transport systems inner membrane component CDS	D -> N
341	3.468.702	(transition)	G -> A	Metal-dependent hydrolases of the beta-lactamase superfamily III CDS	G -> S
342	3.478.658	(transversion)	A -> C	TonB-dependent receptor; Outer membrane receptor for ferric enterobactin and colicins B. D CDS	V -> G
343	3.520.959	(transition)	T -> C	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase F (EC 4.2.1.70) CDS	N -> D
344	3.522.766	(transition)	G -> A	Sorbitol-6-phosphate 2-dehydrogenase (EC 1.1.1.140) CDS	G -> D
345	3.534.717	(transversion)	G -> T	Acetate operon repressor CDS	D -> Y
346	3.541.512	(transversion)	A -> T	Putative acetyltransferase CDS	E -> V
347	3.571.263	(transition)	C -> T	FIG00732435: hypothetical protein CDS	V -> I
348	3.577.306	(transition)	T -> C	probable fimbrial protein staA CDS	
349	3.600.753	(transition)	C -> T	DNA mismatch repair protein MutL CDS	
350	3.606.221	(transition)	A -> G	HflK protein CDS	T -> A
351	3.630.992	(transition)	C -> T	Nitric oxide-dependent regulator DnrN or NorA CDS	
352	3.636.528	(transition)	C -> T	2'.3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase (EC 3.1.4.16) CDS	D -> N
353	3.658.678	(transition)	G -> A	FIG00731333: hypothetical protein CDS	P -> L
354	3.665.660	(transition)	T -> C	Putative inner membrane protein CDS	V -> A
355	3.676.480	(transition)	C -> T	FIG00732152: hypothetical protein CDS	S -> N
356	3.688.491	(transition)	C -> T		
357	3.720.093	(transition)	C -> T	Glyceraldehyde-3-phosphate ketol-isomerase (EC 5.3.1.1) CDS	
358	3.741.616	(transversion)	A -> C		



359	3.773.343	(transition)	G -> A	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases CDS	
360	3.818.838	(transversion)	T -> G	ROK family Glucokinase with ambiguous substrate specificity CDS	D -> A
361	3.829.462	(transition)	G -> A	Formate hydrogenlyase transcriptional activator CDS	R -> W
362	3.856.967	(transversion)	T -> A	Glucitol operon repressor CDS	K -> N
363	3.857.783	(transition)	T -> C	Sorbitol-6-phosphate 2-dehydrogenase (EC 1.1.1.140) CDS	T -> A
364	3.864.939	(transversion)	A -> T	C-terminal domain of CinA type S; Protein Implicated in DNA repair function with RecA and MutS CDS	
365	3.928.019	(transition)	G -> A	L-lysine permease CDS	V -> M
366	3.935.530	(transversion)	G -> T	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.14) CDS	G -> W
367	3.945.879	(transition)	C -> T	Transcriptional activator RfaH CDS	R -> H
368	3.994.538	(transition)	A -> G		
369	4.033.483	(transition)	G -> A		
370	4.039.736	(transition)	A -> G		
371	4.053.219	(transition)	T -> C	Protein YicC CDS	E -> G
372	4.063.771	(transversion)	T -> G	DNA repair protein RadC CDS	D -> E
373	4.086.568	(transition)	C -> T	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (EC 5.4.2.1) CDS	
374	4.094.831	(transversion)	C -> A		
375	4.101.074	(transition)	A -> G	Membrane fusion component of tripartite multidrug resistance system CDS	S -> G
376	4.111.536	(transversion)	A -> T	Xylose activator XylR (AraC family) CDS	M -> K
377	4.135.361	(transition)	A -> G	Epimerase KguE CDS	V -> A
378	4.150.070	(transition)	A -> G	Type IV secretory pathway. VirB4 components CDS	S -> G
379	4.183.186	(transition)	C -> T	Membrane-bound lytic murein transglycosylase C precursor (EC 3.2.1.-) CDS	D -> N
380	4.195.448	(transition)	T -> C	Endonuclease I precursor (EC 3.1.21.1) @ Extracellular deoxyribonuclease Dns (EC 3.1.21.-) CDS	
381	4.219.718	(transition)	A -> G		
382	4.230.173	(transition)	G -> A	Chromosome initiation inhibitor CDS	A -> V
383	4.245.101	(transition)	T -> C	Secreted protein. suppressor for copper-sensitivity ScsC CDS	Q -> R
384	4.252.194	(transition)	C -> T	Folate-dependent protein for Fe/S cluster synthesis/repair in oxidative stress CDS	A -> T
385	4.253.019	(transition)	G -> A	YgfY COG2938 CDS	G -> S
386	4.257.941	(transition)	A -> G	Peptide chain release factor 2; programmed frameshift-containing CDS	D -> G
387	4.261.137	(transition)	A -> G	hypothetical protein CDS	T -> A
388	4.271.087	(transition)	A -> G		
389	4.279.789	(transition)	C -> T	Beta-xylosidase (EC 3.2.1.37) CDS	G -> E
390	4.298.395	(transition)	C -> T	Two-component system response regulator QseB CDS	
391	4.301.526	(transition)	C -> T	Topoisomerase IV subunit B (EC 5.99.1.-) CDS	V -> I
392	4.301.940	(transition)	G -> A	Topoisomerase IV subunit B (EC 5.99.1.-) CDS	R -> C
393	4.304.426	(transition)	C -> T	3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase (EC 3.1.4.17) CDS	E -> K
394	4.308.235	(transition)	G -> A	Similarity with glutathionylspermidine synthase (EC 6.3.1.8). group 1 CDS	V -> M
395	4.309.260	(transition)	A -> G	Similarity with glutathionylspermidine synthase (EC 6.3.1.8). group 1 CDS	
396	4.311.451	(transition)	G -> A	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate	

				synthase (EC 4.1.99.12) CDS	
397	4.313.101	(transition)	C -> T	ADP-heptose synthase (EC 2.7.-.-) / D-glycero-beta-D-manno-heptose 7-phosphate kinase CDS	
398	4.326.870	(transversion)	A -> T		
399	4.329.835	(transition)	C -> T	Decarboxylase family protein CDS	A -> V
400	4.339.370	(transition)	C -> T	Methionine ABC transporter ATP-binding protein CDS	
401	4.425.560	(transition)	C -> T	Lysophospholipid transporter LpIT CDS	A -> T
402	4.442.765	(transition)	T -> C	Sugar-binding protein precursor CDS	
403	4.450.667	(transition)	A -> G		
404	4.451.514	(transversion)	T -> G	2-deoxy-D-gluconate 3-dehydrogenase (EC 1.1.1.125) CDS	Q -> P
405	4.463.426	(transition)	C -> T	putative fimbrial-like protein CDS	G -> R
406	4.477.245	(transition)	G -> A	FIG00644701: hypothetical protein CDS	
407	4.491.820	(transition)	G -> A	COG4834: Uncharacterized protein conserved in bacteria CDS	L -> F
408	4.507.466	(transition)	G -> A	hypothetical protein CDS	
409	4.512.541	(transition)	G -> A	Integrase CDS	
410	4.536.723	(transition)	G -> A	Phage shock protein C CDS	
411	4.568.607	(transition)	G -> A	Cys regulon transcriptional activator CysB CDS	
412	4.568.687	(transversion)	T -> A	Cys regulon transcriptional activator CysB CDS	K -> I
413	4.586.284	(transition)	G -> A	Tryptophan synthase alpha chain (EC 4.2.1.20) CDS	
414	4.611.000	(transversion)	C -> A	Cellobiose phosphotransferase system YdjC-like protein CDS	
415	4.617.756	(transition)	C -> T		
416	4.620.475	(transition)	G -> A	Succinylglutamate desuccinylase (EC 3.5.1.96) CDS	H -> Y
417	4.648.366	(transition)	C -> T	Ribose ABC transport system. permease protein RbsC (TC 3.A.1.2.1) CDS	G -> S
418	4.650.541	(transition)	T -> C	Ribose ABC transport system. high affinity permease RbsD (TC 3.A.1.2.1) CDS	T -> A
419	4.657.160	(transition)	G -> A	Regulatory protein AsnC CDS	G -> S
420	4.658.529	(transversion)	A -> C	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme GidA CDS	D -> A
421	4.698.000	(transition)	A -> G	DNA gyrase subunit B (EC 5.99.1.3) CDS	Q -> R
422	4.732.012	(transition)	G -> A	Hexose phosphate transport protein UhpT CDS	V -> I
423	4.745.823	(transversion)	G -> T	Outer membrane vitamin B12 receptor BtuB CDS	
424	4.753.408	(transversion)	G -> T	hypothetical protein CDS	A -> S
425	4.777.686	(transition)	G -> A	Transcriptional (co)regulator CytR CDS	R -> H
426	4.797.635	(transversion)	T -> A	Predicted L-rhamnose ABC transporter. ATP-binding component CDS	F -> I
427	4.810.346	(transition)	T -> C	Tagatose 1.6-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.40) CDS	M -> V
428	4.815.798	(transition)	G -> A	Formate dehydrogenase O alpha subunit (EC 1.2.1.2) @ selenocysteine-containing CDS	A -> T
429	4.827.405	(transversion)	A -> T		
430	4.847.130	(transition)	G -> A	Methionine ABC transporter substrate-binding protein CDS	
431	4.848.047	(transversion)	G -> T	COG1720: Uncharacterized conserved protein CDS	D -> Y
432	4.848.212	(transition)	G -> A	COG1720: Uncharacterized conserved protein CDS	G -> S
433	4.884.083	(transversion)	G -> T		
434	4.907.013	(transition)	C -> T	hypothetical protein CDS	
435	4.915.899	(transition)	G -> A	General secretion pathway protein L CDS	R -> H
436	4.925.340	(transversion)	C -> A	Poly(A) polymerase (EC 2.7.7.19) CDS	P -> Q

437	4.939.970	(transition)	C -> T		
438	4.940.001	(transition)	C -> T		
439	4.941.196	(transition)	C -> T		
440	4.948.107	(transition)	A -> G		
441	4.959.720	(transition)	A -> G	Ribonucleotide reduction protein NrdI CDS	V -> A
442	4.982.308	(transversion)	C -> A	probable pilin chaperone CDS	E -> D
443	4.992.236	(transition)	C -> T	FIG00731982: hypothetical protein CDS	G -> D
444	4.997.219	(transition)	G -> A	RND multidrug efflux transporter; Acriflavin resistance protein CDS	
445	5.010.217	(transition)	G -> A	Hemolysins and related proteins containing CBS domains CDS	P -> L
446	5.015.960	(transition)	C -> T	FIG00732463: hypothetical protein CDS	
447	5.025.356	(transition)	C -> T	Probable component of the lipoprotein assembly complex (forms a complex with YaeT, YfgL and NlpB) CDS	D -> N
448	5.025.581	(transversion)	T -> G	Probable component of the lipoprotein assembly complex (forms a complex with YaeT, YfgL and NlpB) CDS	S -> R
449	5.027.785	(transversion)	A -> T		
450	5.030.878	(transversion)	A -> C		
451	5.030.879	(transition)	A -> G		
452	5.072.982	(transition)	C -> T	Putrescine transport ATP-binding protein PotG (TC 3.A.1.11.2) CDS	
453	5.078.388	(transition)	C -> T	Osmosensitive K <sup>+</sup> channel histidine kinase KdpD (EC 2.7.3.-) CDS	
454	5.114.629	(transition)	T -> C		
455	5.114.632	(transversion)	C -> G		
456	5.132.322	(transversion)	A -> T	Putative phage protein CDS	
457	5.143.859	(transition)	T -> C	phage lysozyme( EC:3.2.1.17 ) CDS	I -> M
458	5.167.139	(transition)	C -> T	Hypothetical zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein Ydjl CDS	A -> V
459	5.173.039	(transition)	C -> T	Nicotinamidase (EC 3.5.1.19) CDS	A -> T
460	5.173.445	(transversion)	A -> T	L-asparaginase I. cytoplasmic (EC 3.5.1.1) CDS	N -> K
461	5.191.501	(transition)	C -> T	SSU ribosomal protein S4p (S9e) CDS	
462	5.209.766	(transition)	G -> A	hypothetical protein CDS	
463	5.221.943	(transition)	A -> G	hypothetical protein CDS	
464	5.239.971	(transition)	G -> A	Outer membrane usher protein CDS	R -> Q
465	5.252.317	(transversion)	A -> C		
466	5.256.206	(transition)	T -> C	Myo-inositol 2-dehydrogenase (EC 1.1.1.18) CDS	I -> T
467	5.256.587	(transversion)	T -> G	Myo-inositol 2-dehydrogenase (EC 1.1.1.18) CDS	V -> G
468	5.270.168	(transition)	C -> T	HTH-type transcriptional regulator hdfR CDS	A -> T

**Anexo 4:** Tabla en la que se indican las posiciones de inserción del elemento *ISKpn1* en las 96 cepas. Cada columna representa un sitio de inserción y los cuadros rellenos en azul representan la presencia de ese sitio en la cepa.

Kp1									
Kp2									
Kp3									
Kp4									
Kp5									
Kp7									
Kp8									
Kp9									
Kp10									
Kp11									
Kp12									
Kp13									
Kp14									
Kp15									
Kp16									
Kp17									
Kp18									
Kp19									
Kp20									
Kp21									
Kp22									
Kp23									
Kp24									
Kp25									
Kp26									
Kp27									
Kp28									
Kp29									
Kp30									
Kp31									
Kp32									
Kp33									
Kp34									
Kp35									
Kp36									
Kp37									
Kp39									
Kp40									
Kp41									
Kp42									
Kp43									
Kp44									
Kp45									
Kp46									
Kp47									
Kp49									
Kp50									
Kp51									
Kp52									
Kp53									
Kp54									
Kp55									
Kp56									
Kp57									
Kp58									
Kp59									
Kp60									
Kp61									
Kp62									
Kp63									
Kp64									
Kp65									
Kp67									
Kp68									
Kp69									
Kp70									
Kp71									
Kp72									
Kp73									
Kp74									
Kp75									
Kp76									
Kp77									
Kp78									
Kp81									
Kp82									
Kp83									
Kp84									
Kp87									
Kp91									
Kp93									
Kp95									
Kp96									
Kp97									
Kp105									
Kp106									
Kp108									
Kp109									
Kp110									
Kp111									
Kp112									
Kp115									
Kp117									
Kp119									
Kp123									
Kp124									

**Anexo 5:** Tabla en la que se representan el número de copias de genes de resistencia y de plásmidos de dos replicas de la misma cepa. Se trata del mismo aislado, la librería de Kp124 se realizó a partir de DNA genómico y la librería de Kp124 (dil 1:10) a partir del mismo DNA diluido 10 veces.

	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>aadA2</i>	<i>aph(3')-Ia</i>	ATPase	CTX-M-15	OXA-1	OXA-48	SHV-11	TEM-116	<i>catA1</i>
<b>Kp124</b>	6	5	5	1	2	5	6	1	0	5
<b>Kp124 (dil 1:10)</b>	6	5	6	1	2	5	6	1	0	5
	<i>catB3</i>	<i>dfrA12</i>	<i>ftsZ</i>	<i>IncFIB(K)</i>	<i>IncL/M</i>	<i>IncR</i>	<i>mph(A)</i>	<i>mraW</i>	<i>QnrB1</i>	<i>sul1</i>
<b>Kp124</b>	5	6	1	6	6	3	5	1	0	4
<b>Kp124 (dil 1:10)</b>	5	6	1	5	6	3	5	1	0	4

AATCGATCGAAATCGATCGAATCGATCCATAGCATATACGACGACGATCAGCATGCTAGGCCGGATCGCACGTACGAACGAAATCGATCGAATCGCCAT  
CGATCCATAGCATATACGACGACGATCAGCATGCTAGGCCGGATCGCACGTACGAACGAAATCGATCGAATCGCCAT  
TATACGACGAGCATGCAGGCTCGCACGACGACGAAATCGATCGAATCGATCCAGCATATACGACGACGAT  
ATGCTAGGCCGGATCGCCGATCGAATCGATCCATAATCGATCGAATAATCGATCGAATCGATCCAT  
TATACGACGACGATCAGCATGCTGGCCGGATCGCACGAAACGAAATCGATCGTCGATCCATA  
ATACGACGACGATCAGCATGCTAGGCCGGATCGCACGTACGAACGAAATCGATCGA  
CCATAGCATATACGACGAGCATGCAGGCTCGCACGACGACGAAATCGATCGA  
ATCCAGCATATACGACGACGATCAGCATGCTAGGCCGGATCGCCGATCG  
GATCCATAGCATATACGACGCGATCAGCATGCTAGGCCGGATGCTC  
CATAGCATAGCATATACGAATCGATCGAATAATCGATCGAATC  
CATAGCATATACGACGACGATCAGCATGCTGGCCGGATCG  
AACGAAATCGATCGTCGATCCATAGCATATACGACG  
TCAGCATGCTAGGCCGGATCGCACGTACGAACGA  
GATCGAATCGCCATAGCATATACGACGAGCA  
GGCTCGCACGACGACGAAATCGATCGAAT  
CCAGCATATACGACGACGATCAGCATG  
GCCGGATCGCCGATCGAATCGATCC  
CATATACGACGCGATCAGCATGC  
CCGGATGCTCGATCCATAGCA  
CGATCAGCATGCTAGGCCG  
AATCGATCGAATAATCGA  
ATCGATCCATAGCATAT  
CGACGATCAGCATGC  
CGGATCGCACGA  
AATCGATCGTC  
CATAGCATAT  
CGACGATC  
TGCTAG  
GATCG  
TAC  
GA  
G



**Hospital Universitario La Paz**  
Hospital de Cantoblanco  
Hospital Carlos III

 **Comunidad de Madrid**



**Servicio de  
Microbiología  
y Parasitología**

**IdiPAZ**  
Instituto de Investigación  
Hospital Universitario La Paz